

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO**  
**Sistemas de Processos Químicos e Informática**

**Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da  
Bromelina do Abacaxi**

Autor Ana Cláudia Wabiszczewicz Cesar  
Orientador Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Tese de Doutorado apresentada à  
Faculdade de Engenharia Química como  
parte dos requisitos exigidos para a  
obtenção do título de Doutor em  
Engenharia Química.

Campinas - São Paulo  
Dezembro - 2005

AMADA UNICAMP  
C337a  
EX  
O BC/ 69188  
16.123.06  
D 11.00  
06/07/06  
D  
bid 381898

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

C337a Cesar, Ana Cláudia Wabiszczewicz  
Análise de viabilidade econômica de um processo de  
extração e purificação da bromelina do abacaxi / Ana  
Cláudia Wabiszczewicz Cesar.--Campinas, SP: [s.n.],  
2005.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biotecnologia. 2. Extração (Química). 3.  
Bromelina. 4. Abacaxi. I. Tambourgi, Elias Basile. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Bromelain extraction and purification from pineapple economic  
viability studies

Palavras-chave em Inglês: Biotechnology, Separation processes, Liquid-liquid  
extraction, Bromelain, Pineapple

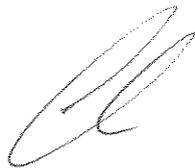
Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora: Ana Paula Brescancini Rabelo, Douglas Alves Cassiano, Luiz  
Carlos Bertevello, Jabra Haber

Data da defesa: 16/12/2005

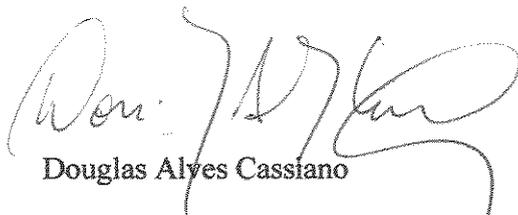
Tese de doutorado defendida por Ana Cláudia Wabiszczewicz César em 16 de dezembro de 2005 e aprovada pela banca constituída pelos doutores:



Elias Basile Tambourgi



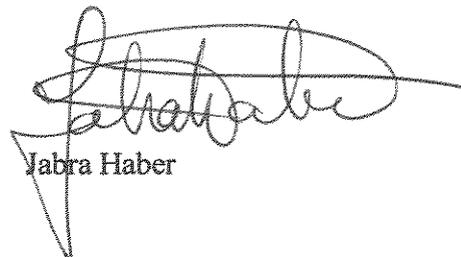
Ana Paula Brescancini Rabelo



Douglas Alves Cassiano



Luiz Carlos Bertevello



Jabra Haber

200614343

Esta versão , corresponde à final da Tese de Doutorado , defendida por Ana Claudia Wabiszczewicz em 16 de dezembro de 2005.

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping loops and strokes, positioned above the printed name.

Prof Dr Elias Basile Tambourgi  
orientador

Aos meus pais Ary Cesar e  
Janina Wabiszczewicz Cesar(*in memoriam*)

## **Agradecimentos**

À Deus, por ter me dado oportunidade de merecer este caminho.

Ao Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi pela orientação, confiança e amizade.

Aos Prof.s Dr.s Jabra Haber, Júlio César Dutra e Luiz Carlos Bertevello, pelo apoio e pelas valiosíssimas contribuições.

Aos professores da UNINOVE pelo apoio, colaboração e discussão dos resultados.

Ao amigo médico, Odair Manzini Jr., por demonstrar, à sua maneira, a importância da minha determinação para conclusão deste trabalho.

Ao prezado amigo MsC.Paulo Eduardo Orlandi Mattos da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, por partilhar a paixão e o conhecimento pelos bioprodutos.

À minha família, pelo amor, paciência e compreensão nas minhas ausências.

Aos meus fiéis companheiros Fábio De Chiara e Giovanni Cesar De Chiara, sem os quais, não teria motivos para seguir nesta jornada.

## NOTAÇÃO E NOMENCLATURA

A	Atividade Enzimática (U)
A <sub>e</sub>	Atividade Específica (U/mg)
A <sub>e</sub> <sub>fundido</sub>	Atividade específica da Fase Inferior
A <sub>e</sub> <sub>topo</sub>	Atividade Específica da Fase Superior
ABIFARMA	Associação Brasileira da Indústrias Farmacêuticas
BSA	Albumina Bovina ( Bovine Serum Albumin)
C <sub>f</sub>	Concentração da Fase Inferior
C <sub>t</sub>	Concentração da Fase Superior
CT	Custo Total
Da	daltons
g/g	Grama/grama
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
K	Coefficiente de Partição
K <sub>bioesp</sub>	Fator de Afinidade Bioespecífica
KDa	Kilo Dalton
K <sub>conf</sub>	Fator de Conformação
K <sub>eletro</sub>	Fator eletroquímico
K <sub>hfob</sub>	Fator de afinidade hidrofóbica
K <sub>tam</sub>	Fator Tamanho
M	Molaridade ou Molar
MPEG	Massa Molecular do PEG
P	Proteína Total (mg/L)
PEG	Polietileno Glicol
pI	Ponto Isoelétrico
P <sub>topo</sub>	Concentração de Proteínas na Fase Superior (mg/L)
P <sub>fundido</sub>	Concentração de Proteínas na Fase Inferior (mg/L)
p/p	Peso/peso
PV	Preço de Venda
R	Retorno sobre o Investimento
s	Desvio padrão
SBA	Sistemas Bifásicos Aquosos
Sefeitpo	Desvio Padrão dos Efeitos
TCA	Ácido Tricloroacético
v/v	Volume/volume
X <sub>m</sub>	Média dos resultados Obtidos
X <sub>i</sub>	Grandeza Medida

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplo de um Diagrama de Fases.	32
Figura 2: Ciclo de vida de um produto	41
Figura 3: Preparo da amostra	59
Figura 4: Descrição dos testes de liquefação da gelatina .	60
Figura 5: Resultados dos volumes de perfuração da gelatina.	61
Figura 6: Curva de solubilidade em etanol da bromelina e das proteínas presentes no abacaxi	63
Figura 7 : Esquema da micro-coluna de campânulas pulsantes.	64
Figura 8: Variação do preço de venda em relação à margem de lucro.	78
Figura 9: Evolução do preço de vendas em função da margem de lucro	81
Figura 10: Prazo de retorno sobre investimento (payback) em função as margem de lucro	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados da concentração das amostras de polpa do fruto, casca e talo do abacaxi.	07
Tabela 2: Dados de proteína total, atividade e açúcares redutores.	07
Tabela 3 - Produção de Frutas, Brasil – 1994/1995 e 2004/2005 (1000 toneladas)	07
Tabela 4: Produção Mundial de abacaxi em 2005.	08
Tabela 5: Vantagens e desvantagens da liderança tecnológica	44
Tabela 6: Exemplo de aplicação de um modelo de pontuação para avaliação de projetos.	56
Tabela 7: Resultados do volume de perfuração (VP)	61
Tabela 8– Variáveis estudadas na operação da Micro-coluna	67
Tabela 9 - Descrição dos níveis e efeitos.	69
Tabela 10 - Efeitos calculados para porcentagem de recuperação de proteína total	69
Tabela 11 - Porcentagem de recuperação de proteína total	70
Tabela 12 - Cálculo dos efeitos para recuperação da proteína total	70
Tabela 13 - Porcentagem de recuperação de atividade enzimática	71
Tabela 14 - Cálculo dos efeitos para recuperação de atividade enzimática	72
Tabela 15 : Descrição dos valores de investimento em equipamentos para extração	75
Tabela 16: Custos de matéria -prima para produção de 8 kg de precipitado.	76
Tabela 17: Descrição de despesas e tributos	77
Tabela 18 : Variação do Preço de venda em Função da Margem de Lucro	77
Tabela 19: Quantidade de precipitado necessária para o retorno sobre o investimento em função da margem de lucro	78
Tabela 20: Custos de equipamentos para extração em contínuo.	79
Tabela 21: Custos com matéria -prima para extração em contínuo	79
Tabela 22: Custos com matéria- prima para purificação na obtenção de 1 grama	80
Tabela 23: Evolução de preço de venda do extrato purificado em função da margem de contribuição.	80
Tabela 24: Quantidade em gramas de extrato purificado a ser vendida em função da margem de lucro para retorno sobre investimento	81

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas e Figuras	VII
1. INTRODUÇÃO	01
2. FUNDAMENTAÇÃO	03
2.1. Proteínas	03
2.1.1. Bromelina	03
2.1.2. Enzimas	05
2.1.3. Desnaturação	06
2.1.4. Proteína Total, Atividade e Açúcares Redutores	06
2.2. Abacaxi	07
2.2.1. Fruticultura Brasileira	07
2.2.2. Cultivo e Colheita	08
2.2.3. Caracterização da Fruta	10
2.2.4. Composição Química	11
2.2.5. Processamento da Fruta	11
2.2.6. Produtos e Subprodutos do Processamento.	12
2.3. Consumo de Bromelina.	15
2.4. Separação e Purificação de Proteínas	17
2.4.1. Precipitação por Etanol	18
2.4.2. Extração Líquido-Líquido	20
2.4.2.1. Sistemas de Duas Fases Aquosas	20
2.4.2.2. Tipos de Sistemas de Duas Fases Aquosas	23
2.4.2.3. Sistema PEG/Sal	24
2.4.2.4. Polietileno Glicol	25
2.4.2.5. Recuperação de Sais e Polímeros	26
2.4.3. Teoria de Formação das Fases	27
2.4.3.1. Tempo de Separação das Fases	29
2.4.3.2. Fatores que Influenciam no Sistema de Fases	30
2.4.3.3. Diagrama de Fases	31
2.4.4. Fundamentos da Partição das Proteínas	33
2.4.4.1. Coeficiente de Partição	34
2.4.4.2. Influência do Peso Molecular do Polímero e da Proteína no Coeficiente de Partição	34
2.4.4.3. Influência do pH do Sistema no Coeficiente de Partição	35
2.4.4.4. Influência das Interações entre a Proteína e o Sistema de Fases no Coeficiente de Partição	36
2.4.4.5. Influência da Concentração dos Componentes do Sistema no Coeficiente de Partição	36
2.4.4.6. Influência da Concentração de Proteínas no Coeficiente de Partição	37
2.4.4.7. Modelagem Matemática do Coeficiente de Partição	37
2.5. Planejamento Fatorial	38
3. INOVAÇÃO TECNOLÓGICA	39
3.1. Tecnologia e Inovação	39
3.2. Desenvolvimento de Produtos	40
3.3. Liderança Tecnológica	42
3.4. A Adoção de uma Nova Tecnologia	45

4. CUSTOS	48
4.1. Custos Diretos e Custos Indiretos	48
4.1.1. Fatores que Afetam as Classificações de Custos Diretos Indiretos	49
4.2. FIXAÇÃO DO PREÇO DE VENDA	51
4.2.1. Formação de Preços com Base em Custos	51
4.3. ANÁLISE ECONÔMICA DE PROJETOS	52
4.3.1 Avaliação de Projetos de Inovação Tecnológica	55
4.3.2. Modelo de Decisão por múltiplos Atributos ou de Pontuação	55
4.4. Análise Linear de Equilíbrio	57
4.4.1. Ponto de Equilíbrio entre Receitas e Despesas	57
5. MATERIAIS E MÉTODOS	59
5.1. Extração por Batelada	59
5.1.1. Preparo da Amostra	59
5.1.2. Extração com Etanol	60
5.2. Extração em Contínuo	64
5.2.1 Descrição do Equipamento	64
5.2.2. Procedimentos de Operação da Micro-Coluna	65
5.2.3. Variáveis Estudadas	66
5.3. Extração Contínua Utilizando Uma Micro-Coluna De Campânulas Pulsantes	67
5.3.1. Planejamento de Ensaios	68
5.3.2 Efeito da Razão entre as vazões das fases (RV) e da Frequência da pulsação (FP) das Campânulas na Porcentagem de Recuperação de Proteína Total com Bromelina P.A.	69
5.3.3. Efeito da Razão entre as vazões das fases (RV) e da Frequência da pulsação (FP) das Campânulas na Recuperação de Proteína Total.	69
5.3.4. Efeito da Razão entre as vazões das fases (RV) e da Frequência da pulsação (FP) das Campânulas na Recuperação da Atividade da Bromelina.	70
5.4. Métodos Analíticos	72
5.4.1. Determinação de Proteína Total	72
5.4.2. Determinação da Atividade Enzimática	72
5.5. Metodologia de Cálculo	73
5.5.1. Coeficiente de Partição	73
5.5.2. Atividade Específica	74
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	75
6.1. Custos da Extração por Batelada	75
6. 2. Custos de Purificação	79
7. COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES	83
8. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS	85
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	86
ANEXOS	95

## RESUMO

O Brasil encontra-se entre um dos maiores produtores mundiais de abacaxi ocupando o terceiro lugar no ranking mundial. Visando o aproveitamento do material considerado resíduo agrícola (caule e folhas) e resíduos do processamento do fruto, muitos estudos tem sido realizados para a obtenção de enzimas proteolíticas do abacaxi. As enzimas proteolíticas de origem vegetal são provenientes principalmente do figo (ficina), do mamão (papaína) e do abacaxi (bromelina). Por bromelina entende-se o conjunto de enzimas proteolíticas produzidas por plantas da família das *Bromeliaceae*. É uma enzima de amplo uso na indústria alimentícia para o amaciamento de carne e clarificação da cerveja, para o amaciamento de couro, e na indústria farmacêutica, em medicamentos destinados a distúrbios de digestibilidade, e também por sua ação antiinflamatória e antimucolítica. O desenvolvimento de novos processos de extração e purificação de proteínas é muito importante, uma vez que esta é uma etapa **limitante** na produção de bioprodutos. O presente trabalho propõe um processo de recuperação da bromelina do fruto de abacaxi por técnica de precipitação do caldo prensado com etanol frio onde foram obtidos resultados demonstrando que em uma precipitação em 1 estágio com 80% v/v de etanol a 5°C é possível recuperar praticamente toda a enzima originalmente presente, aumentando de 3 a 5 vezes a atividade específica inicial e purificação através da extração líquido-líquido em duas fases aquosas, formado por duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis entre si, obtidas pela adição de polímeros hidrofílicos ou um desses polímeros e um sal, como o sistema PEG ( polietileno glicol ) e o fosfato de potássio. O trabalho apresenta um estudo sobre os custos do processo e estimativas sobre o preço de venda e retorno sobre o investimento, demonstrando a viabilidade econômica da proposta quer para utilização como pré-processo nos tradicionais sistemas cromatográficos, quer para sua comercialização direta, como alternativa para o produtor do abacaxi, ou do fabricante de sucos e compotas.

Palavras Chave: Custos, Abacaxi, Extração Líquido-Líquido

## ABSTRACT

Brazil is one of the world's largest producers of pineapples, its production being the third one in the world. To take advantage of the residues from fruit processing, many studies have been conducted to obtain proteolytic enzymes from them. These proteolytic enzymes are extracted mainly from fig (ficine), papaya (papain), and pineapple (bromelain). Bromelain is a mixture of proteolytic enzymes found in Bromeliaceae family. It is an enzyme with ample use in food industry for meat tenderizer and beer clarification, in leather and pharmaceutical industries, in drugs for digestion disorders, anti-inflammatory action, and anti-colitis action. The development of new extraction and purification processes of proteins is very important, as this is a limiting step in the production of byproducts. The present work proposes a recovery process of bromelain from pineapples by precipitation of their pressed juice with cold ethanol, whereby a one stage precipitation with 80% v/v of ethanol at 5°C made possible the recovery of practically all originally present enzyme, increasing from 3 to 5 times the initial specific activity and purification by a liquid-liquid extraction in two aqueous phases, formed by immiscible aqueous phases or partially miscible ones, which are obtained from the addition of hydrophilic polymers or one of these polymers and a salt, such as PEG system (polyethylene-glycol) and potassium phosphate. This work presents a study about the costs of this process and the estimated sale prices as well as its return of investment, showing its economic viability, whether it is for use as a pre-process in traditional chromatographic systems or direct commercialisation, as an alternative for the pineapple producer of the juice market.

Key-words: costs, pineapple, liquid-liquid extraction

## 1. INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro produz frutos de sabor e aroma aceitáveis no mundo todo. O Brasil é um grande produtor de abacaxi, sendo conhecidas cinco espécies de *Ananas* e uma de *Pseudoananas*. Dentro da espécie *Ananas comosus* estão incluídos todos os cultivos de interesse agrícola, onde os principais cultivados no Brasil são o Pérola e o Smooth Cayenne (SANTOS, 1995).

O abacaxi fruto é a parte comercializável da planta, porém, esta porção representa somente 63% do total da planta, enquanto que o restante, formado por caule, folha, casca, coroa e talos, é considerado resíduo agrícola, e não tem sido devidamente aproveitado, resultando em perdas econômicas. Trabalhos já realizados demonstram que estes resíduos apresentam teores representativos de carboidratos, proteínas e enzimas proteolíticas, que possibilitam a sua utilização industrial como matéria-prima para a obtenção de bromelina, amido, fibras, álcool etílico e rações animais (BALDINI et.al., 1993).

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido. A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Pode-se mencionar sua utilização no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no tratamento do couro, na indústria têxtil, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado, etc.

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana. Técnicas mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração geralmente tem alto poder de concentração e baixa purificação e técnicas mais modernas como a cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração com micela reversa, recuperam e purificam, com alto grau de seletividade.

---

A separação de proteínas de meios aquosos por precipitação é um dos métodos mais tradicionais para a recuperação e parcial purificação dessas biomoléculas. Os precipitados de proteínas são agregados de moléculas protéicas, grandes o suficiente para serem decantados ou centrifugados. É uma técnica de fácil ampliação de escala e com viabilidade para operação contínua a custos aceitáveis para grandes volumes. Porém é uma técnica mais de concentração do que propriamente de purificação.

A extração líquido-líquido é uma operação unitária de transferência de massa, utilizada para separação de componentes presentes em uma mesma solução, distribuindo-se entre as duas fases líquidas e insolúveis entre si.

A extração em duas fases aquosas é uma técnica que vem sendo aplicada na indústria, principalmente em separação de enzimas, por se tratar de um processo de baixo custo, alta seletividade e com possibilidade de reciclagem dos reagentes. Além disso, as enzimas permanecem estáveis no sistema, devido à alta concentração de água e à utilização de reagentes não desnaturantes.

O interesse em novos processos biotecnológicos vem crescendo substancialmente nas últimas décadas e os estudos nesta área estão bastante consolidados. Porém para que os mesmos possam contribuir de forma efetiva para a sociedade, há a necessidade de definição dos custos dos processos desenvolvidos para tornar os processos científicos tangíveis aos olhos dos investidores.

Assim, o presente trabalho faz uma análise dos custos diretos de fabricação envolvidos na proposta de um processo de recuperação e purificação da bromelina do abacaxi, baseado na análise dos processos de precipitação por etanol e extração líquido-líquido em duas fases aquosas.

---

## 2. FUNDAMENTAÇÃO

### 2.1. Proteínas

Berzelius cunhou a palavra proteína em 1838, para salientar a importância dessa classe de moléculas. Proteína vem do grego *Proteios*, que significa “o que vem em primeiro lugar”, sendo responsáveis pelo funcionamento das funções vitais dos organismos animais, nos quais são alguns dos principais constituintes.

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes nas células e constituem 50% ou mais de seu peso seco. São encontradas em todas as partes das células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celular. Existem muitas espécies diferentes de proteínas, cada uma especializada em determinada função biológica diferente.

#### 2.1.1. Bromelina

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido. As enzimas proteolíticas encontradas nos talos recebem o nome de bromelina do talo e tem o número sistemático EC 3.4.22.4, e as encontradas no fruto são chamadas de bromelina do fruto ou ainda, bromelina e tem o número sistemático EC 3.4.22.5. A bromelina é uma glicoproteína, tendo um resíduo oligossacarídeo por molécula, que está covalentemente ligado à cadeia peptídica. A bromelina do talo é uma enzima sulfidrídica, e este grupamento é essencial para a sua atividade proteolítica. A bromelina do fruto é uma proteína ácida, e seu ponto isoelétrico foi determinado por focalização isoelétrica como pH 4,6 e mudanças conformacionais irreversíveis ocorrem em valores de pH maiores que 10,3 (MURACHI, 1976).

A enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém, seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, onde tem um pequeno decréscimo. Essa é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi em comparação com outras proteases vegetais. Apesar da diminuição da atividade proteolítica durante a maturação, o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro. No mamão e no figo, tanto a papaína como a ficina, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde; com o completo amadurecimento, a concentração de proteases praticamente desaparece.

---

Diferentes partes da planta podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção da bromelina: folhas, talos, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do processamento do fruto.

Outras fontes de enzimas proteolíticas são as proteases microbianas, por exemplo, de: *Bacillus subtilis*, *Aspergillus* sp., *Actinomyces* sp., e as proteases animais tripsina (EC 3.4.21.4) e pepsina (EC 3.4.23.1), além das vegetais papaína (EC 3.4.22.2), ficina (EC 3.4.22.3) já citadas. Algumas das proteases microbianas são geralmente proteases alcalinas e têm sido usadas na produção de sabões e detergentes para a remoção de manchas de sangue, por exemplo.

A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Pode-se mencionar sua utilização no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no tratamento do couro, na indústria têxtil, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado etc. Foi verificado por ROWAN *et. al.* (1990) que a bromelina do fruto tem uma atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos protéicos, e sua atividade é máxima em pH 8,0 e a temperatura de 70°C. A bromelina do talo apresentou atividade máxima a 60°C e pH 7,0. A forma de bromelina comercialmente encontrada é a bromelina do talo, apesar da grande quantidade de resíduos de abacaxi fruto proveniente das indústrias de conservas de abacaxi.

As preparações de bromelina são impuras, e geralmente as principais enzimas contaminantes são outras enzimas proteolíticas e enzimas não proteolíticas, tais como: fosfatases, peroxidases, celulases e outras glicosidases (MURACHI, 1976). SUH *et. al.* (1992) purificou a bromelina do fruto e do talo até a homogeneidade (18 e 46 vezes de aumento de pureza respectivamente) por cromatografia de gel-filtração e determinou os pesos moleculares em 32.5 e 37 KDa respectivamente, com rendimento de 23% em atividade. MURACHI (1976) purificou a bromelina do talo de abacaxi por cromatografia de gel-filtração, e determinou que o peso molecular da fração pura era de 28 KDa por SDS-PAGE. (ROWAN *et. al.* 1990) descreve a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxis (*Ananas comosus*): bromelina do fruto, bromelina do talo, ananaína e comosaína.

---

### 2.1.2. Enzimas

A maior parte da história da bioquímica é a história da pesquisa sobre enzimas. A catálise biológica inicialmente descrita e reconhecida no início do século XIX, em estudos sobre a digestão da carne por secreções do estômago e a conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por vários extratos vegetais. Na década de 50, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por fermentos. Ele postulou que esses fermentos depois nomeados de enzimas eram inseparáveis da estrutura das células vivas do levedo, uma hipótese que prevaleceu por muitos anos. Em 1897, Eduard Buchner, descobriu que extratos de levedo podiam fermentar o açúcar até o álcool, provando que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando mesmo quando removidas da estrutura das células vivas. Desde então numerosos estudos vêm sendo realizados na tentativa do isolamento das numerosas enzimas diferentes e o estudo de suas propriedades catalíticas.

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas. A maioria das moléculas biológicas é muito estável no ambiente aquoso de pH neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. Muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são muito improváveis nas condições do ambiente celular, como a formação transiente de intermediários eletricamente carregados e instável ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa e necessária para que ocorra a reação. ( LEHNINGER, 1995).

As reações necessárias para digerir alimentos, enviar sinais através de nervos, ou contrair um músculo simplesmente não ocorrem em velocidade útil sem catálise.

Uma enzima contorna estes problemas fornecendo um ambiente específico dentro do qual uma reação dada é energeticamente mais favorável. A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade, ou fenda, na estrutura molecular da enzima chamado sítio ativo. A molécula que se liga ao sítio ativo e que sofre a ação da enzima é chamada substrato. O complexo enzima-substrato tem papel central na reação enzimática, sendo ponto de partida para os tratamentos matemáticos que definem o comportamento cinético das reações catalisadas enzimaticamente e para as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos.

---

### 2.1.3. Desnaturação

Quando uma solução de proteína, como a albumina do ovo, é aquecida lentamente até 60<sup>o</sup> ou 70<sup>o</sup> C, a mesma torna-se gradualmente leitosa e logo forma um coágulo. Isto é comum já que ocorre quando fervemos ovos em água. A clara do ovo, que contém albumina, coagula pelo aquecimento num sólido branco. Depois que o calor coagulou a clara não sofre redissolução pelo resfriamento, nem forma outra vez uma solução límpida como a original. Portanto, o aquecimento transformou a ovoalbumina e, aparentemente, de forma irreversível. Esse efeito do aquecimento ocorre virtualmente com todas as proteínas, não importando seu tamanho ou função biológica, embora a temperatura exata para provocá-lo varie. A mudança provocada pelo calor e outros agentes é conhecida como *desnaturação*.

Há outra importante consequência da desnaturação de uma proteína, que quase sempre, perde sua atividade biológica característica. Assim, quando uma solução aquosa de uma enzima, por exemplo, é aquecida até seu ponto de ebulição por uns minutos e depois resfriada, a enzima torna-se insolúvel e, principalmente, não mais apresenta atividade catalítica.

A desnaturação de proteínas pode ser provocada não apenas pelo calor, mas também por valores inadequados de pH, por solventes orgânicos, por solutos como a uréia, pela exposição da proteína a alguns tipos de detergentes, pela agitação vigorosa da solução protéica até formação abundante de espuma, presença de certos íons ou sais caotrópicos na solução que contém as proteínas, oxidação, força iônica, entre outros. Cada uma das formas citadas como causa de desnaturação pode ser considerada como tratamento relativamente suave, isto é, a desnaturação pode ocorrer em condições amenas, não há necessidade de ocorrer em condições drásticas. As moléculas de proteína nativa são frágeis e facilmente desorganizadas pelo calor e outros tratamentos aparentemente suaves.

### 2.1.4. Proteína Total, Atividade e Açúcares Redutores

CESAR (1999) realizou análises de proteína total, açúcares redutores e atividade enzimática de amostras preparadas da polpa do fruto, da casca e do talo para a caracterização do meio inicial. As concentrações e os resultados são mostrados nas Tabelas 1 e 2. O fruto e o talo apresentam o mesmo teor de proteína total, porém o talo apresenta cerca de 60% menor quantidade de enzimas proteolíticas. O abacaxi utilizado para as

análises foi o fruto maduro, por isso apresentou uma quantidade elevada de açúcares redutores expressos em glicose, 0,2 a 0,4 g/g de abacaxi. De qualquer forma, o talo e a casca do abacaxi maduro tem um teor de enzima considerável para recuperação, como é mostrado na Tabela 2, ainda mais se tratando de resíduo de muitas indústrias de conservas.

Tabela 1: Dados da concentração das amostras de polpa do fruto, casca e talo do abacaxi.

	massa (g)	V <sub>água</sub> (mL)	V <sub>TOTAL</sub> (mL)	Concentração
Fruto	1734,11	600	3420	507 g polpa/L
Casca	850,50	1000	1074	792 g casca/L
Talo	413,54	400	980	422 g talo/L

Tabela 2: Dados de proteína total, atividade e açúcares redutores.

	Proteína Total (mg/L)	Atividade Enzimática (mg/g)	Açúcares Redutores (U/L)
Fruto	1127,00	2,22	1428,50
Casca	842,30	1,06	865,00
Talo	893,70	2,12	431,50

## 2.2. Abacaxi

### 2.2.1. Fruticultura Brasileira

A fruticultura brasileira cresceu consideravelmente nos últimos dez anos, como podemos observar utilizando os dados comparativos de produção dos biênios 1994/1994 e 2004/2005 apresentados na Tabela 3 .

FRUTA	2005	2004	1994	1995
Abacaxi	2.279	2.297	1.558	1.463
Banana	6.606	6.691	7.438	7.384
Laranja	17.998	18.270	14.213	16.004
Maçã	827	973	456	432
Uva	1.133	1283	807	825

Tabela 3 - Produção de Frutas, Brasil – 1994/1995 e 2004/2005 (1000 toneladas)

Fonte: IBGE (07/2005) Fatores de conversão : abacaxi: 1,6 kg/fruto; banana 13kg/cacho; maçã 130gramas/fruta ; laranja 250 frutos por caixa com 40,8 kg.

No Estado de São Paulo, devido aos diferentes ciclos de maturação (desde muito precoces até tardias) e as diversas regiões de cultivo, pode-se dizer que a época de colheita das frutas se estende por nove meses até pelo ano todo. No caso das frutas de clima temperado e subtropical a colheita se inicia em setembro e se prolonga até junho, enquanto que para tropicais pode durar o ano todo.

Em razão de sua posição geográfica e do cultivo das variedades especialmente criadas ou adaptadas para as condições de inverno brando, com poucas horas de frio abaixo de  $7,2^{\circ}\text{C}$ , a produção paulista é mais precoce que as dos estados do Sul do Brasil, assim como de países produtores como Argentina, Uruguai e Chile, o que traz vantagens econômicas, devido a ausência de concorrentes no início da safra. Ao mesmo tempo, para várias espécies permite-se que sejam exportadas para países do hemisfério Norte quando não há produção regional tendo condições de adentrarem os mercados com redução ou ausência de tarifas aduaneiras de importação.

### 2.2.2. Cultivo e Colheita

O abacaxizeiro é uma planta muito sensível ao frio, mas resiste bem à seca. Exige, por isso, clima quente ou mesotérmico, onde não há perigo de ocorrência de geadas. A temperatura média favorável situa-se entre  $21$  e  $27^{\circ}\text{C}$ . Quando a temperatura se mantém acima de  $32^{\circ}\text{C}$ , verificam-se danos na planta devido à transpiração excessiva; quando a temperatura cai abaixo de  $20^{\circ}\text{C}$ , a planta entra em estado de inatividade (MEDINA, 1978). Portanto, o Brasil possui um clima muito favorável para a produção do fruto. Na Tabela 4 podemos observar que o país encontra-se em segundo lugar no ranking mundial de produção do fruto, contribuindo com mais de 13% da produção mundial.

ABACAXI	PRODUÇÃO(t)	PRODUÇÃO(t/ha)
Mundial	15.288.018	843.231
	PRODUÇÃO (t)	PRODUÇÃO (t/ha)
Tailândia	1.900.000	87.000
Filipinas	1.759.290	48.230
Brasil	1.435.190	54.683
China	1.320.000	70.500
Índia	1.300.000	90.000

Tabela 4: Produção mundial de abacaxi em 2005. Fonte: FAO (2005). Atualizado em fevereiro/2005.

---

Os frutos colhidos durante o verão apresentam melhor qualidade do que os amadurecidos durante o inverno. Aqueles se apresentam mais aromáticos e mais ricos em sólidos solúveis, menos ácidos e com maior conteúdo de óleos voláteis.

O momento da colheita depende do fim a que se destinam os frutos. Se for para a fabricação de conservas, deve-se aguardar até que os frutos fiquem maduros, ou seja, o momento em que suas qualidades organolépticas sejam ótimas. Mas, se destina-se à exportação como fruta fresca, a colheita deve ser feita com antecipação para que sua maturação total não ocorra até o momento em que seja ofertado ao consumidor. É preciso, contudo, neste caso, não colher frutos demasiado verdes.

A coloração da casca é habitualmente tomada como indicação para julgar se um fruto está ou não maduro. A madureza da polpa e a coloração da casca ocorrem progressivamente, iniciando-se ambas pela base do fruto e se estendendo paulatinamente para o ápice. Tal avaliação, contudo, é muito mais difícil do que parece à primeira vista, pois há necessidade de se levar em conta o tamanho do fruto, as condições ecológicas, por ocasião da sua maturação e variedade do produto.

O abacaxizeiro frutifica dentro de 24 meses após o plantio, quando as mudas são do tipo coroa. De modo geral, pode-se obter 15 a 20 mil frutas por hectare, por safra, servindo este valor como média para as variedades.

A época da colheita está intimamente relacionada à época de plantio e ao tipo e idade da muda. O plantio no Estado de São Paulo é feito de dezembro a fevereiro, no período que coincide com a colheita das frutas (época de maior produção) e, conseqüentemente, época favorável para obtenção de mudas.

As colheitas das frutas de um abacaxizal não podem ser feitas por meios mecânicos, pois as frutas não amadurecem todas ao mesmo tempo. Todavia, no Havaí e em outras regiões onde a cultura do abacaxi é feita com alto nível técnico, os trabalhos de colheita são grandemente facilitados graças à utilização de uma esteira rolante, na qual as frutas são colocadas e transportadas para fora dos talhões tão logo sejam colhidas.

No Brasil, o trabalho de colheita geralmente é feito com auxílio de um facão, com o coletor tendo as mãos protegidas por luvas de lona grossa. Enquanto com a mão esquerda segura o fruto pela coroa, com a direita secciona, com o facão, a haste a 5-6 cm abaixo da fruta. As frutas colhidas vão sendo entregues a outro coletor, que é encarregado

---

de transportá-las em cestas até a margem do carreador. Necessita-se, em média, três carregadores para cada colhedor. A produtividade média é de 30.000 a 40.000 frutos/ha/ano.

Em geral, a comercialização do abacaxi é feita com o fruto ainda no campo, antecipadamente e a granel. Leva-se em conta o tamanho e a aparência do fruto, de acordo com os padrões das variedades. Para os grandes mercados consumidores ao natural, seguem os frutos de primeira qualidade, sadios e com peso igual ou acima de 1,5 kg. Os que não atingem esse padrão são vendidos nos mercados locais, perto das regiões produtoras, ou são destinados à industrialização.

### **2.2.3. Caracterização da Fruta**

Em vista da grande comercialização do abacaxi, tanto no mercado interno como internacional, e também para a indústria, e cuja produção agrícola vem aumentando de ano para ano, os produtores devem procurar manter um padrão de qualidade da fruta a fim de garantir sua comercialização.

Para isso, é necessário que sejam observadas as seguintes características:

-COR: a cor revela nas frutas o seu grau de maturação, o que, apesar de ser uma apreciação subjetiva, permite distinguir a qualidade do produto. O abacaxi deverá apresentar uma coloração uniforme, porém sem estar muito maduro, o que é indesejável, tanto para a indústria como para o mercado consumidor.

-TAMANHO: a uniformidade de tamanho é bastante importante, principalmente para a indústria, onde os diferentes comprimentos e diâmetros das frutas afetam a regulagem das máquinas (ginaca, principalmente).

- SABOR: é importante conhecer a relação Brix/acidez total titulável da variedade que vai ser comercializada ou industrializada. Essa relação varia de ano para ano, de acordo com as condições climáticas (principalmente), e também com a estação do ano. Há, portanto, grandes variações entre as safras de verão e de inverno .

-FORMA: esta característica afeta o descascamento mecânico e, portanto, o rendimento, devendo ser a fruta de forma cilíndrica para evitar uma perda excessiva de polpa nessa operação. A variedade *Smooth Cayenne* de origem havaiana, apresenta frutas

---

mais uniformes e cilíndricas do que a variedade Pérola (brasileira), que vem facilitar e muito o trabalho das ginacas e um menor desperdício de fruto na indústria de compotas.

#### **2.2.4. Composição Química**

O abacaxi apresenta uma variação muito grande na sua composição química, de acordo com a época em que é produzido. De modo geral, a sua produção ocorre no verão, sendo sua colheita uniformizada através da indução química do seu florescimento.

Neste caso, as frutas apresentam maior teor de açúcares e menor acidez. Por outro lado, as frutas produzidas fora de época, ou seja, as frutas temporãs, apresentam alta acidez e baixo teor de açúcares, visto a produção ocorrer nos meses que a temperatura ambiente é baixa.

O valor nutricional das frutas de abacaxi depende, principalmente, dos seus açúcares solúveis, das vitaminas e dos sais minerais que contém, uma vez que os teores de proteínas e de lipídeos são relativamente baixos.

O abacaxi é uma fruta deliciosa, muito apreciada em todos os países tropicais; sua polpa sucosa, saborosa e ligeiramente ácida é muito refrescante. Ao lado das qualidades organolépticas, que o distinguem universalmente, há seu alto valor dietético, comparável ao das melhores frutas tropicais. O suco de abacaxi é um alimento energético, pois um copo do mesmo propicia cerca de 150 calorias ao organismo humano. O teor de açúcares varia em geral em torno de 12 a 15%, dos quais aproximadamente 66% são de sacarose e 34% de açúcares redutores. As cinzas, que apresentam 0,4-0,6% do peso total, são ricas em bases, principalmente em potássio, ao qual seguem o magnésio e cálcio, geralmente em partes iguais, e essas características permanecem em sua maioria nos resíduos triturados do abacaxi para o processamento da bromelina, sendo então este resíduo de grande interesse por suas características de alta riqueza nutricional.

#### **2.2.5. Processamento da Fruta**

O comércio mundial de abacaxi *in natura* atingiu 700 mil toneladas, e o comércio de abacaxi transformado em suco ou conserva é equivalente a quatro milhões de toneladas de frutas frescas (AGRIANUAL, 2000).

O fruto presta-se tanto para consumo ao natural como para processamento industrial em suas mais diversas formas (pedaços em calda, suco, pedaços cristalizados,

---

geléias, licor, vinho, vinagre e aguardente). Como subproduto da sua industrialização, pode-se obter álcool, ácidos cítrico, málico e ascórbico, rações para animais e bromelina (enzima proteolítica de uso medicinal). O talo da planta pode ser aproveitado para extração de bromelina, sendo também fonte de amido. As folhas podem ser utilizadas para a obtenção de fibras. De alto valor dietético, a polpa do abacaxi é energética (150 calorias por copo de suco); contém boa quantidade das vitaminas A e B1 e da C, não contendo a D. Contém, ainda, a bromelina que favorece a digestão.

A fruta em calda, que é o principal produto industrializado do abacaxi, ocupa, atualmente, a segunda posição em vendagem no mercado internacional, logo em seguida do pêssego em calda.

As técnicas industriais de preparo de fatias e pedaços para enlatamento são conhecidas internacionalmente. Linhas completamente automatizadas encontram-se em várias fábricas espalhadas pelo mundo tais como Havaí, Formosa, Filipinas, Tailândia, Austrália, África do Sul e outros países, no mundo todo.

Essas linhas, com capacidade de 80 a 120 frutas por minuto, apresentam, atualmente, rendimentos próximos de 46% de partes sólidas da fruta para enlatamento.

#### **2.2.6. Produtos e Subprodutos do Processamento.**

Na grande indústria do abacaxi, a industrialização da fruta é integrada. Isso significa que não existe uma indústria trabalhando com um ou dois produtos, mas procura-se tirar o máximo de rendimento da fruta em relação ao produto principal (fruta em calda) e aos produtos de caráter secundário (como é o caso do suco simples e do suco concentrado), e mesmo os subprodutos, como é o caso específico do suco da casca e resíduos e da ração, esta última utilizada na alimentação animal.

O processamento tem início com a lavagem das frutas, que chegam do campo em grandes recipientes ou carretas, já desprovidas da coroa que pode ser utilizada para o replantio da fruta. A seguir, as frutas são conduzidas por meio de transportadoras para uma seção superior onde a lavagem é completada. Um sistema de transportadores conduz as frutas lavadas para um segundo pavimento, no qual, é feito um corte em uma das extremidades da fruta. Essa operação tem por finalidade principal eliminar as partes restantes da coroa e talo, a fim de facilitar o trabalho posterior da máquina ginaca. Essas

---

partes eliminadas, seguem, por meio de um transportador, para a linha de processamento de ração.

Na etapa seguinte, ainda no segundo pavimento, as frutas são selecionadas por tamanho, seleção esta que é feita por meio de roscas sem fim, dispostas de tal forma que permitem a classificação das frutas em três tamanhos distintos: grande, médio e pequeno.

As frutas de tamanho médio constituem aproximadamente 60 a 65% do total de abacaxis que entram na usina de processamento.

O processo tem por finalidade dar um fluxo contínuo às fases posteriores, reduzindo assim a capacidade ociosa da ginaca. Esta máquina cujo nome foi dado em homenagem a seu inventor o engenheiro havaiano de sobrenome Ginaca, é completamente automatizada e de grande capacidade (80-120 frutas por minuto), executando uma série de operações sucessivas, e que são as seguintes: - corte das extremidades, descascamento da fruta e encaminhamento do cilindro à etapa seguinte do processamento. O equipamento também é dotado de um dispositivo raspador, que erradica a polpa da casca e das extremidades do fruto. A maior parte deste material erradicado (polpa erradicada) se destina à produção de “*crush*” (espécie de salada de frutas) e uma pequena parte à produção de suco .

Nas ginacas de produção mais antiga também havia um dispositivo para remoção do miolo do cilindro da fruta

Dentro de um sistema mais moderno, conhecido como “sistema de processamento de abacaxi em dois diâmetros” da Honiron, a remoção da parte central do cilindro da fruta é feita em fase posterior. Esse sistema permite maior rendimento industrial em termos sólidos, pois o cilindro é cortado em fatias quando ainda inteiro, isto é, com miolo, e estas apresentam maior resistência mecânica à remoção do miolo, reduzindo-se assim, o número daquelas quebradas.

Nas diversas linhas de ginaca geralmente encontradas nas grandes indústrias de abacaxi do mundo, a máquina é usualmente regulada para o processamento de frutas dos três tamanhos anteriormente mencionados.

Pode-se então observar, uma boa fonte da matéria-prima a ser utilizada no processo de recuperação e purificação de enzimas do abacaxi, visto que, uma das maiores

---

dificuldades da indústria de processamento do fruto é a venda do suco, obtido como subproduto e posteriormente reprocessado, tratado, pasteurizado e embalado para comercialização em um mercado que não responde à produção de suco devido ao seu alto custo ocasionado pelo tratamento.

Do total de frutos produzidos nos Estados Unidos da América em 2003, aproximadamente 73% foram industrializados (FAO, 2005) e os restantes 27% consumidos na forma fresca. Do total mundial industrializado, 46% foram comercializados no mercado mundial, com seu valor de mercado quintuplicado graças aos custos de processamento, embalagem e distribuição.

O Brasil diferencia-se completamente dos grandes produtores e consumidores mundiais de abacaxi, pois quase toda sua produção é consumida na forma fresca, sendo a quantidade industrializada insignificante (BERTEVELLO, 2001). Portanto, uma das principais fontes de matéria prima para a extração de enzimas no Brasil, não seriam os subprodutos do processamento e sim os resíduos agrícolas, especialmente a sua haste (*stem*) que tem demonstrado bons resultados nos mais recentes estudos de extração e purificação (RABELO, 2004) e nas aplicações terapêuticas da Bromelina (MYNOTT, 1999).

Uma maneira que vem sendo estudada para a utilização dos subprodutos é a silagem dos resíduos do abacaxi. A silagem de resíduos industriais de abacaxi, por apresentar características nutricionais próximas à da silagem de milho, poderia substituí-la como fonte de volumoso para animais em confinamento. Além da qualidade nutricional, é um produto de baixo custo por ser considerado um resíduo, diferente de outros freqüentemente utilizados, como por exemplo, a silagem de milho, que apresenta altos valores no período de entressafra do milho, sendo que neste período também há queda na produção de forragem. Dessa maneira, o produtor passaria a dispor de mais uma alternativa de produto, seja durante o período de escassez de forragem, ou como alimento para confinamento.(PRADO et all, 2003).

A composição química da silagem de resíduos industriais de abacaxi varia em função do tipo de resíduo gerado, ou seja, de acordo com o produto da indústria, compondo assim, o resíduo, de diferentes partes da planta ou do fruto. RODRIGUES & PEIXOTO (1990) utilizaram frutos descartados sem coroa, cascas e miolos, como resíduo ensilado, e obtiveram valores de 12,93% de matéria seca (MS); 3,95% de proteína bruta (PB); 62,76%

de fibra em detergente neutro (FDN) e 41,27% de fibra em detergente ácido (FDA). Em outro trabalho, RODRIGUES & PEIXOTO (1990), utilizando outro tipo de resíduo, não ensilado, composto de frutos descartados, casca, miolo e coroa. Por outro lado, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos com o uso de resíduos de plantas de abacaxi após colheita. Este resíduo é constituído da parte superior da planta do abacaxi após a colheita do fruto. MÜLLER (1978) observou que a composição química dos resíduos das plantas do abacaxi e dos resíduos da indústria de conserva é nutricionalmente diferente.

Todos estes dados reforçam a idéia que subprodutos poderiam ser usados na alimentação animal, principalmente pelo fato de contribuírem para minimizar os custos de produção, lembrando sempre que a silagem oriunda de frutos contém alta porcentagem de água, que acaba dificultando o transporte dos mesmos, devendo a propriedade localizar-se próxima à indústria geradora de resíduos. Da mesma forma, este produto pode apresentar deficiência em energia e proteína ou ambos, exigindo o fornecimento de uma fonte de suplementação adequada (PRADO, 2003)

Segundo Prado (2003) a silagem de resíduos industriais de abacaxi apresentou composição química e características fermentativas (cor, odor e pH) favoráveis, podendo ser utilizada como alimento alternativo para terminação de bovinos de corte, em confinamento, sem alterar o desempenho do animal ou o rendimento da carcaça.

### **2.3. Consumo de Bromelina.**

Para a utilização de bromelina, a indústria alimentícia não se apresenta como um mercado atrativo pois, vem sendo largamente utilizada a papaína no amaciamento de carnes e a grande barreira seria romper o cartel de indústrias produtoras da enzima, pois o consumidor só compra a carne amaciada ou o amaciante de carnes sem preocupar-se com o princípio ativo do produto. Também, atualmente a África do Sul vem produzindo e exportando papaína a preços muito reduzidos.

A indústria de cervejas, onde a bromelina pode ser usada como clarificante, aboliu a utilização da mesma, alegando que esta enzima produz resíduos de difícil retirada dos tanques de armazenagem do produto.

A concentração principal está na indústria farmacêutica brasileira. Bromelina é uma mistura que contém enxofre, proteína da enzima digestiva (enzima proteolítica ou protease), obtida no caule da planta do abacaxi. Bromélia foi reconhecida como agente

---

medicinal em 1957 e, desde então, mais de 200 documentos integraram a literatura medicinal. A Bromelina tem sido muito bem documentada pelos seus efeitos em todas condições inflamatórias, além de ter sua eficácia provada em vários outros problemas de saúde tais como: angina, indigestão e problemas respiratórios.

Introduzida pela primeira vez como composto terapêutico em 1957, a ação da bromelina inclui: inibição da agregação plaquetária, atividade fibrinolítica, ação antiinflamatória, ação antitumoral, modulação de citocinas e imunidade, propriedade debridante de pele, aumento da absorção de outra drogas, propriedades mucolíticas; facilitador da digestão, acelerador da cicatrização, melhora da circulação e sistema cardiovascular. Bromelina é bem absorvida por via oral e a evidência disponível indica que sua atividade terapêutica aumenta com as doses mais altas. Apesar de todos os seus mecanismos de ação ainda não estarem totalmente esclarecidos, foi demonstrado que é um seguro e efetivo suplemento. A bromelina parece ter tanto ação direta quanto indireta, envolvendo outros sistemas enzimáticos, ao exercer seus efeitos antiinflamatórios. (MATTOS, 2005).

A bromelina, uma protease sulfídrica presente nesta espécie, é, talvez, o enfoque científico mais estudado. Isto se dá pela importância desta proteína na farmacologia, onde foi registrada sua interferência no crescimento de células malignas, inibição de coágulos, atividade fibrinolítica e ação antiinflamatória (TAUSSIG & BATKIN, 1998). O *Ananas comosus* é um produto fitoterápico com ação mucolítica e fluidificante das secreções brônquicas e das vias aéreas superiores (HEBRON, 2005). Contribui para a melhor fluidificação das secreções mucosas do paciente, graças às propriedades mucolíticas e fluidificantes destas enzimas, conforme pesquisas realizadas pela Universidade Federal de Pernambuco, Universidade de Pernambuco e Universidade Federal da Paraíba. As enzimas bromelina, ribonuclease, glucose oxidase, invertase e diastase contidas no *Ananas comosus*, catalizam a quebra de ligações entre as ligações peptídicas, pela incorporação de moléculas de água, facilitando, assim a fluidificação do muco espesso. A bromelina é uma endopeptidase que não necessita de sistema precursor para desempenhar suas atividades farmacológica e terapêutica. Além disso, o *Ananas comosus* contém os cátions divalentes dos oligoelementos magnésio, manganês, zinco, ferro e cálcio, que atuam como cofatores nas funções das referidas enzimas.

---

As enzimas proteolíticas são aplicadas em formulações tópicas com a finalidade de reduzir a espessura da camada córnea da pele por hidrolisar, em pontos específicos, a queratina cutânea. É um peeling mais suave e seguro, comparado aos tradicionais peelings químicos, e mais eficaz que os métodos físicos comumente usados em formulações cosméticas (RACINE, 2004).

A Bromelina é também usada em forma de solução para preparação de suspensão de hemácias a ser utilizada na tipagem sanguínea .

O principal foco industrial da produção de bromelina é a indústria farmacêutica que é um dos setores que mais investe em tecnologias e novos produtos, tendo realizado uma previsão de investimentos no período de 1997 – 2000 de US\$ 1.300 milhões (ABIFARMA). Reflexos do plano econômico, do primeiro mandato do governo de Fernando Henrique Cardoso, que melhorou substancialmente o poder aquisitivo dos brasileiros que estão investindo em saúde e medicamentos, o que vem refletindo no aumento da expectativa de vida pois, segundo o IBGE, o número de idosos atualmente é o dobro do registrado em 1980 (CESAR, 2000).

Ainda segundo César (2000), até bem pouco tempo atrás um novo remédio que era lançado no mercado brasileiro não tinha a sua fórmula protegida. Então, logo que era lançado, sem proteção legal, um concorrente logo aparecia. A proteção legal é muito importante na indústria de farmacológicos pois chega-se a gastar 15 anos com pesquisas, o que gera um investimento de capital em torno de US\$ 700 milhões . Com esta proteção que dura 20 anos até a patente ser de conhecimento público.

#### **2.4. Separação e Purificação de Proteínas**

Muitas técnicas tem sido utilizadas para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana. Técnicas mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração geralmente tem alto poder de concentração e baixa purificação e técnicas mais modernas com a cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração com micela reversa, recuperam e purificam, muitas vezes até a homogeneidade.

O processo de separação e purificação de bioprodutos, também chamado “*downstream processing*”, é atualmente um segmento muito importante na indústria, pois

---

pode chegar a representar de 80 a 90% do custo de produção. Portanto, o desenvolvimento de um processo eficiente e de baixo custo é de extrema importância (BELTER et al, 1998).

A grande questão ao iniciar um processo de purificação é o grau de pureza exigido para a proteína. Proteínas para fins terapêuticos ou de uso direto em humanos necessitam de um alto grau de pureza, o que não é necessário para as enzimas que serão aplicadas em processos industriais. Em uma purificação em larga escala, o processo normalmente consiste de 4 a 6 etapas que podem ser divididas em dois grupos. O primeiro é formado pelos processos de recuperação da proteína: separação e ruptura de células, separação dos fragmentos e concentração da proteína. No segundo grupo o objetivo é purificar a proteína, utilizando-se das etapas de pré-tratamento ou isolamento primário, purificação de alta resolução e refinamento final.

A purificação de proteínas encontra muitas dificuldades, do ponto de vista técnico, e exige um elevado número de etapas. Por exemplo, a remoção dos fragmentos das células é difícil devido ao pequeno tamanho das partículas e à viscosidade da solução. As etapas de concentração podem levar a baixos rendimentos e reprodutibilidade limitada. Os procedimentos de alta purificação, como a cromatografia, é limitado pela escala de operações e pelo custo das resinas. Por isso, a extração líquido-líquido vem despertando tanto interesse a fim de ser utilizada como uma etapa intermediária de separação, que substitui métodos de separação mais caros ou diminui o número de etapas de separação necessárias ao processo (RABELO, 1999).

A purificação e separação de proteínas baseadas nos princípios de partição em sistemas de duas fases aquosas tem sido muito desenvolvido nos últimos anos. Esta técnica de extração parece ser especialmente adequada para as primeiras etapas dos procedimentos de separação, mas pode substituir etapas cromatográficas ou ser aplicada antes da cromatografia. (HUSTEDT et al, 1985).

#### **2.4.1. Precipitação por Etanol**

A separação de proteínas de meios aquosos por precipitação é um dos métodos mais tradicionais para a recuperação e parcial purificação dessas biomoléculas. Este método implica na alteração da estrutura tridimensional da proteína, desconformando-a, e pode ser agressivo, sendo aplicado somente quando a ressolubilização do precipitado é possível. Os precipitados de proteínas são agregados de moléculas protéicas, grandes o suficiente para

---

serem decantados ou centrifugados. É uma técnica de fácil ampliação de escala e com viabilidade para operação contínua a custos aceitáveis para grandes volumes. Porém, é uma técnica mais de concentração do que propriamente de purificação.

A solubilidade das proteínas depende da distribuição de grupos ionizáveis, zonas hidrofóbicas e hidrofílicas na superfície da molécula. Tais características são responsáveis por interações polares com o solvente aquoso, interações iônicas com os sais presentes no meio, além da repulsão eletrostática entre moléculas de mesma carga. A presença de sais, solventes orgânicos e o pH são fatores importantes na solubilidade das proteínas (SCOPEs, 1994).

A adição de solventes orgânicos miscíveis tais como etanol, metanol ou acetona a um meio aquoso contendo proteínas causa uma variedade de efeitos, os quais, combinados provocam a precipitação da proteína. O solvente destrói a camada de hidratação hidrofóbica em torno das zonas hidrófobas e passa a circundar tais regiões devido à maior solubilidade destas em meio ao solvente. Com isso, as regiões carregadas com carga positiva ou negativa da superfície da proteína podem interagir, atraindo-se umas às outras, formando agregados. As interações do solvente com as zonas hidrófobas internas causam uma desconformação irreversível da proteína. Isto pode ser minimizado pela redução da temperatura até valores da ordem de zero ou abaixo, pois a baixas temperaturas a flexibilidade da molécula é menor, reduzindo a capacidade de penetração do solvente e a desnaturação irreversível das proteínas, sendo que, os álcoois de cadeia mais longa apresentam maior efeito desnaturante do que os de cadeia mais curta (SCOPEs, 1994).

Uma carga global próxima a zero na superfície da proteína, o que acontece no ponto isoelétrico das proteínas ( $\text{pH} = \text{pI} =$  ponto isoelétrico), minimiza a repulsão eletrostática podendo causar precipitação por interação entre as zonas hidrofóbicas, e esse processo chama-se precipitação isoelétrica, e é realizado apenas com a correção do pH. De modo geral, a precipitação por qualquer método escolhido é facilitada no ponto isoelétrico da proteína. A adição de sais neutros, principalmente  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  a elevadas concentrações 1,5 a 3,0 M, reduz a disponibilidade da água devido à hidratação dos íons, criando condições para a precipitação, a qual ocorre principalmente por interação das zonas hidrófobas. O sal e outros precipitantes não provocam a precipitação de todas as proteínas pois o seu efeito é o de reduzir a solubilidade. Com isso, a concentração de sal ou solvente

---

que provoca a precipitação varia com a concentração da proteína e a presença de outras proteínas contaminantes. Este fato é aproveitado para a realização de um fracionamento.

A precipitação é uma operação unitária muito comum, e amplamente utilizada na separação de proteínas. A vantagem da utilização do etanol como agente de precipitação encontra-se na abundância e baixo custo deste solvente, tornando a recuperação da enzima economicamente interessante, além do fato de que o etanol pode ser reciclado ao processo por uma operação de destilação, reduzindo impactos ambientais pela liberação de efluentes, como é o caso da precipitação com sulfato de amônio. As desvantagens do uso de etanol são: a necessidade de operação em baixa temperatura para minimizar a desnaturação da enzima, e o perigo de inflamabilidade deste solvente.

### **2.4.2 Extração Líquido-Líquido**

Uma situação comum na Engenharia Química é a separação dos constituintes de uma mistura líquida homogênea composta de dois ou mais componentes. Para realizar esta separação existem vários métodos cuja aplicação é limitada pelas características físicas e químicas dos componentes da mistura a ser separada, pelos custos do processo de separação e pelas condições disponíveis para a implantação do processo escolhido.

A extração líquido-líquido é um processo que envolve a transferência de massa entre dois líquidos imiscíveis. Na extração líquido-líquido, a separação de um componente de uma solução líquida homogênea ocorre pela adição de um constituinte líquido, insolúvel ou parcialmente solúvel, o solvente, no qual o componente a ser extraído da solução, o soluto, é preferencialmente solúvel. O soluto difunde-se no solvente com uma velocidade característica até atingir as concentrações de equilíbrio em cada uma das fases formadas. Este processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre as fases e a miscibilidade parcial dos líquidos (RABELO, 1999).

#### **2.4.2.1. Sistemas de Duas Fases Aquosas**

Na escolha de meios de extração para aplicações em biotecnologia, vários critérios devem ser considerados, já que nesta área alguns parâmetros tais quais, solubilidade e estabilidade dos compostos são importantes e não podem ser desprezados. Entre estes critérios deve-se citar (PORTO, 1998):

- O meio não deve ser tóxico ao sistema biológico nem ao homem;

- 
- A recuperação do bioproduto a partir do meio extrator deve ser fácil;
  - Deve ter baixo custo e estar disponível comercialmente em grande quantidade;
  - Ser possível de esterilizar;
  - Ser imiscível ou parcialmente miscível com soluções aquosas;
  - Não deve apresentar tendências de formação de emulsões estáveis com materiais biológicos;
  - Não ser inflamável.

Além disso, em processos de extração líquido-líquido aplicados a quaisquer sistemas, é imprescindível que os solventes escolhidos formem duas fases (sejam imiscíveis ou parcialmente miscíveis) e tenham densidades diferentes. Além destes fatores a separação entre as fases deve ser rápida.

Nos processos biotecnológicos, em que se opera com biomoléculas ou células, existe um número muito limitado de solventes adequados a serem usados. Assim, a introdução dos sistemas de duas fases aquosas em processos biotecnológicos é uma alternativa que possibilita o emprego da extração líquido-líquido nestes processos, já que estes sistemas caracterizam-se por ajustar-se aos critérios requeridos pelos processos de bioseparação (MATIASSON et al, 1987).

O uso de solventes orgânicos é, normalmente, limitado pelas características hidrofílicas dos produtos de fermentação, levando à necessidade de utilização de elevadas razões entre as fases orgânica e aquosa, devido aos baixos coeficientes de partição dos produtos em relação ao solvente orgânico. Além disso, os solventes orgânicos são geralmente tóxicos para as proteínas e, também, provocam desnaturação das mesmas.

Sistemas de duas fases aquosas formam-se pela adição de soluções aquosas de dois polímeros hidrofílicos, como PEG (polietileno glicol) e dextrana ou de um polímero e um sal, como PEG e fosfato de potássio. A fase mais leve é rica em polietileno glicol enquanto a fase mais pesada é enriquecida com dextrana ou sais. Os polímeros e os sais são solúveis em água, mas são incompatíveis entre si e se separam em duas fases (ALBERTSSON, 1986). Eles constituem um meio conveniente e adequado para a extração de substâncias de origem biológica pois a constituição das fases, entre 70% e 90% de água, proporciona um

---

ambiente ameno para o trabalho com compostos biologicamente ativos, preservando sua estabilidade molecular e permitindo, assim, o seu processamento neste meio (COIMBRA,1995).

A separação espontânea, em fases distintas, devido a adição de soluções aquosas de dois polímeros foi inicialmente observada pelo microbiologista holandês Beijerinck, em 1956, ao misturar ágar com gelatina ou amido solúvel. A fase inferior era rica em ágar e a superior em gelatina (ou amido). Em 1956, Albertsson constatou que sistemas formados por polímeros solúveis e solventes orgânicos também possibilitam a partição de materiais biológicos, ou seja, permitiam que uma terceira substância introduzida no sistema fosse coletada, preferencialmente, numa das fases por ajuste de parâmetros físico-químicos. Devido a esta particularidade os sistemas de duas fases aquosas são empregados no isolamento e purificação de biomoléculas de importância comercial, tais como, proteínas, vírus, fragmentos de membranas e organelas celulares. De acordo com ALBERTSSON (1986), é possível ter uma separação bastante seletiva de substâncias usando sistemas aquosos de polímeros.

Os sistemas de duas fases aquosas formados por PEG-Dextrana- Água e PEG-Sal-Água têm sido, nos últimos anos, os mais freqüentemente estudados e utilizados para purificação de um grande número de biomoléculas (DIAMOND et al, 1992)

ALBERTSSON (1986) reconheceu a possibilidade de utilizarem-se sistemas de duas fases aquosas como um método de separação aplicado a materiais biológicos sob condições que preservam a sua atividade biológica. Além disso, os sistemas de duas fases aquosas são usados também na determinação de propriedades superficiais de biomoléculas, tais como, carga e hidrofobicidade. Assim, ao lado de trabalhos no campo tecnológico existe também o interesse na utilização da partição como meio de preparação de amostras para uso em técnicas analíticas. Para tanto, são aplicados os diferentes tipos de sistemas de duas fases aquosas existentes.

A variada faixa de aplicabilidade dos sistemas de duas fases aquosas tem estimulado o estudo a fim de estabelecer fundamentos para o trabalho com estes sistemas, além de identificar os mais adequados para a separação de diferentes biomoléculas. (GUAN et al, 1993)

ALBERTSSON (1971) comparou sistemas de duas fases aquosas com os solventes mais convencionais, de acordo com a natureza hidrofóbica, hidrofílica. A fase rica em sal é mais hidrofílica e a fase rica em PEG( polietilenoglicol) é mais hidrofóbica.

Considera-se que a separação de moléculas, incluindo proteínas, em sistemas de duas fases aquosas é dependente das características da superfície molecular dos compostos a serem particionados tais como: carga, tamanho e propriedades hidrofóbicas.

A extração com sistemas de duas fases aquosas oferece certas vantagens para o processamento em larga escala. Algumas delas são: o elevado rendimento, a faixa de trabalho próxima do equilíbrio, a fácil ampliação de escala (“*scale up*”) e o processamento contínuo. Com isto, o interesse na aplicação de sistemas de duas fases aquosas deixou de se restringir à biologia celular para concentrar-se na análise dos fundamentos da separação de fases e da partição de proteínas, na redução dos custos do processamento, no aumento da seletividade da extração (por exemplo, pela adição de ligantes), na pesquisa de novos componentes formadores das fases, especialmente para substituir a dextrana, que é um componente de elevado custo, e na operação em múltiplos estágios (COIMBRA, 1995).

#### **2.4.2.2. Tipos de Sistemas de Duas Fases Aquosas.**

Existem várias substâncias que podem formar duas ou mais fases aquosas ao se misturarem. Estas substâncias podem ser polímeros ou compostos de baixo peso molecular, como os sais, que permitem a separação de fases.

Os sistemas de duas fases aquosas podem ser divididos em quatro grandes grupos (ALBERTSSON, 1986):

a) dois polímeros não iônicos

exemplos: PEG/ficoll, PEG/Dextrana, PEG/polivinil álcool, polipropileno glicol/dextrana, metil celulose/hidroxipropildextrana, ficoll/dextrana;

b) um polieletrólito e um polímero não iônico

exemplos: sulfato dextrana de sódio/polipropileno glicol, carboximetildextrana de sódio/PEG, carboximetilcelulose de sódio/ metil celulose;

c) dois polieletrólitos

---

exemplos: sulfato dextrana de sódio/carboximetildextrana de sódio, carbometildextrana de sódio/carboximetil celulose de sódio;

d) um polímero não iônico e um composto de baixo peso molecular

exemplo: polipropileno glicol/fosfato de potássio, PEG/fosfato de potássio, metoxipolietileno glicol/fosfato de potássio, polipropileno glicol/glicose, PEG/glicose, PEG/sulfato de magnésio, PEG / citrato de sódio.

Há ainda novos sistemas formados por PEG/FeSO<sub>4</sub> e PEG/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que apresentam algumas vantagens em relação aos sistemas com sais de fosfato e citrato, como, por exemplo, o baixo nível de PEG na fase salina, que reduz as perdas do PEG e facilita a purificação das biomoléculas e a reciclagem do PEG. Nesse tipo de sistema foi observado que a concentração de sal na fase PEG e a concentração na fase salina tendem a diminuir com o aumento da temperatura (PATHAK et al, 1991).

Apesar da grande variedade de sistemas de duas fases aquosas, a quantidade de sistemas realmente aplicáveis para extração líquido-líquido fica reduzida basicamente aos formados por PEG/sal (fosfato/citrato/sulfato) e PEG/dextrana, quando se levam em consideração fatores importantes do ponto de vista industrial, como custo e possibilidade de reciclagem dos reagentes, tempo de separação das fases, possibilidade de esterilização, atoxicidade e faixa de aplicação. Devido a tais fatores, os estudos mais recentes tendem a concentrar-se mais nesses dois sistemas, sendo o sistema PEG/sal o mais estudado devido ao seu baixo custo e menor tempo de separação das fases em relação ao sistema PEG/dextrana (COIMBRA, 1995).

#### **2.4.2.3. Sistema PEG/Sal**

A formação de sistemas PEG/sal foi primeiro observada por Albertsson nos anos 50, mas os fundamentos teóricos ainda não são bem explicados.

Eles foram introduzidos para a aplicação prática da separação de proteínas em larga escala devido à maior diferença de densidade entre as fases, menor viscosidade e menores custos; levando a uma separação mais rápida que para os sistemas PEG/dextrana. A aplicação industrial de sistemas PEG/sal foi incentivada e desenvolvida pela disponibilidade de separadores comerciais que permitam separações de proteínas continuamente e de forma mais rápida. (KULA, 1990 e FRANCO,1992).

---

Para sistemas PEG/sal, os efeitos de “*salting out*” parecem atuar aumentando o comprimento da linha de amarração, retirando as proteínas da fase salina para a fase rica em PEG, ou, se a solubilidade da proteína na fase rica em PEG não for suficiente, elas tendem a precipitar na interface. Os limites de solubilidade e “*salting out*” são dependentes das proteínas, portanto uma resposta diferencial é esperada quando uma mistura de proteínas é manipulada (KULA,1982).

#### 2.4.2.4. Polietileno Glicol

O polietileno glicol,  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , é um poliéster sintético neutro, linear ou de cadeia ramificada, disponível numa grande variedade de pesos moleculares, de poucas centenas à milhares de daltons. Solubiliza-se em água e em diferentes solventes orgânicos. A sua solubilização em água é atribuída à ligação das moléculas de água a muitas ou todas as moléculas em torno da cadeia de polietileno. Essa ligação ocorre pelo mecanismo de pontes de hidrogênio. Ligações deste tipo são relativamente fracas e podem ser quebradas de várias maneiras.

O PEG é também conhecido pelos nomes comerciais de poliglicol E®, carbowax E®, dependendo da empresa que o fabrica. Para pesos moleculares acima de 20000 daltons são denominados óxidos de polietileno, PEO. São fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas se possuem pesos moleculares menores que 1000. Os de pesos moleculares elevados, acima de 1000, são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos. Podem ser estocados à temperatura ambiente, embora a 4<sup>0</sup> C a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada. A oxidação do PEG, detectada pela diminuição do pH devida a liberação de grupos ácidos, altera a coloração da solução para marrom (COIMBRA, 1995).

Sendo não antigênico nem imunogênico foi aprovado pelo FDA, “*Food and Drug Administration*”. Devido à sua capacidade de formação de uma camada protetora, o PEG pode diminuir a taxa de rejeição de materiais em sistemas biológicos em humanos. Devido às suas propriedades, o PEG tem uma série de aplicações farmacêuticas, biológicas e bioquímicas. Ele pode formar um composto ativado PEG-proteína que mantém a proteína ativa e diminui consideravelmente a reação imune, além de aumentar o tempo de vida de soros sanguíneos. Ele pode ser ligado também a superfícies, formando uma camada protetora e biocompatível, para ser empregado em aparelhos de diagnósticos, substituição

de artérias e dispositivos relacionados a sangue. O “PEG protetor” pode ser usado também para evitar a adsorção de proteínas em análises bioquímicas de eletroforese por zona capilar, que é uma importante técnica analítica empregada em bioquímica. Além disso, o PEG pode ser usado com lipossomas para a liberação controlada e distribuição seletiva de medicamentos, pois os lipossomas sem o PEG podem ser rapidamente atacados e eliminados do corpo humano, sem cumprir a sua função. Por ser solúvel em muitos solventes orgânicos, o PEG pode ser utilizado para solubilizar enzimas neste meio sem desnaturá-las através da formação de uma camada protetora. Além disso, compostos insolúveis em água podem tornar-se solúveis quando ligados ao PEG, como por exemplo substratos de enzimas, cofatores, corantes, etc. (HARRIS, 1992).

#### **2.4.2.5. Recuperação de Sais e Polímeros**

A possibilidade de reutilização dos constituintes das fases deve ser considerada ao se efetuar o “*scale up*” pois os custos dos componentes das fases aumentam linearmente com a escala de produção (KRONER et al., 1982).

A reciclagem de PEG pode ser facilmente integrada ao processo, chegando a níveis de recuperação em torno de 90 a 95% (HUSTEDT et al., 1988). As técnicas de recuperação de PEG mais usadas são a ultrafiltração e a extração com solvente orgânico seguida de evaporação (COIMBRA, 1995).

O descarte de sais é geralmente mais problemático. Em sistemas contendo células, ácido nucleico, proteínas solúveis e insolúveis, a separação de sais da fase primária por técnicas de separação mecânica, tais como a centrifugação ou ultrafiltração é muito difícil de ser conduzida eficientemente. A eletrodialise é considerada um método geral para a reciclagem de sais e para a dessalinização da fase rica em PEG (HUSTEDT et al., 1988). Sais também podem ser recuperados usando uma mistura álcool alifático-sal-água. Especificamente para a separação de fosfato de potássio, um resfriamento abaixo de 6<sup>o</sup> C provoca a precipitação do sal, possibilitando a sua reutilização (PAPAMICHAEL et al., 1992, COIMBRA, 1995).

GREVE & KULA (1991) recentemente estudaram maneiras de reciclar a fase fosfato desses sistemas para minimizar a poluição ambiental. A reciclagem da fase fosfato foi obtida pela sua separação através do uso de álcoois. O PEG da fase do topo rica em

---

PEG pode também ser reciclado, como pode ser visto em alguns trabalhos de KULA E HUSTEDT, principalmente.

### **2.4.3. Teoria de Formação das Fases**

Existem diversos modelos e teorias para a formação dos sistemas de duas fases aquosas que tentam prever a curva binodal dos sistemas polímero-polímero e polímero-sal. A existência de tantos modelos deve-se ao pouco conhecimento das misturas líquido-líquido, principalmente de polímeros e soluções eletrolíticas. Na realidade não existe, até o momento, uma boa compreensão das teorias de misturas de líquidos. (CABEZAS Jr, 1996)

A grande maioria dos modelos está contida em dois grupos básicos: um grupo baseado na teoria da solução de polímeros, e outro grupo com teorias adaptadas dos tratamentos termodinâmicos do equilíbrio de fase líquida. Dentro desses dois grupos, a modelagem de formação das fases pode ser dividida em quatro tipos: modelos baseados em expansão virial osmótica; modelos baseados na extensão da teoria de Flory-Huggins; modelos incorporando a teoria da equação integral como principal elemento; modelos que não se encaixam em nenhuma destas categorias, como o modelo de volume excluído. Existe ainda, o modelo Pitzer que é o mais aplicável para os sistemas polímero-sal. No caso dos sistemas polímero-sal, ainda não existem muitas teorias que se apliquem bem a este tipo de sistema, pois a maioria não considera o efeito dos eletrólitos nas soluções, levando a um erro na modelagem da formação das fases. Além disso, o estudo de tais sistemas ainda é muito recente (CABEZAS Jr, 1996, WU et al, 1996, WALTER et al. 1991).

As condições utilizadas para a modelagem da formação das duas fases são a igualdade dos potenciais químicos de cada componente (o solvente, a água, e os solutos, o polímero ou sal) nas duas fases aquosas e o balanço de massa de cada componente, ambos após o equilíbrio entre as fases (CABEZAS Jr, 1996).

O modelo de expansão virial osmótico ficou mais conhecido com o desenvolvimento do trabalho de Edmond e Ogston. O equacionamento matemático e a interpretação física dos parâmetros do modelo não são complicados. Existem dois tipos diferentes de expansão virial osmótica: uma é a teoria de McMillan - Mayer e a outra é a teoria de Hill. Na teoria de McMillan - Mayer, o solvente é tratado como uma substância sem características especiais, e, portanto considera-se somente a interação entre as

moléculas do soluto, simplificando muito os mecanismos estatísticos do problema. Porém, aqui existe a necessidade de correção da pressão pois como o solvente não é importante, o seu potencial químico deve ser constante e independente do soluto e portanto a pressão não pode ser constante. Logo, para se utilizar esse modelo em condição de pressão constante, deve-se acrescentar a pressão osmótica da solução. Já a teoria de Hill não considera o solvente como uma substância secundária e por isso os potenciais químicos dos componentes podem ser determinados em temperatura e pressão constantes (CABEZAS Jr, 1996).

A teoria da treliça é uma idéia de modelagem macromolecular de misturas líquidas em termos de uma treliça de cristal. A idéia principal é que em uma treliça as macromoléculas e as moléculas pequenas podem se distribuir e redistribuir até que todos os arranjos ou configurações possam ser estudados. Basicamente é um estudo estatístico de como essas moléculas podem ser arranjadas. A teoria de Flory-Huggins utiliza-se destes princípios. É a mais utilizada em sistemas polímero-polímero, chegando a oferecer uma ótima aproximação da curva binodal. A sua grande vantagem em relação a outras teorias é a simplicidade aliada à qualidade de suas previsões e correlações da formação de fases. Nesse modelo o sistema é representado por uma treliça tridimensional, onde cada lado é preenchido com uma molécula de solvente ou um segmento de um dos polímeros. O problema básico é obter a expressão da energia livre de Gibbs de mistura. Existem tentativas de adaptar esta teoria para os sistemas polímero-sal, porém estes modelos ainda não estão muito ajustados para a formação de fases neste tipo de sistema (CABEZAS Jr, 1996, WALTER et al, 1991, BROOKS et al., 1985, WU et al., 1996).

Outra teoria muito utilizada nos sistemas polímero-polímero, para modelar a curva binodal, é a do volume excluído, baseada em argumentos estatísticos e geométricos: as duas fases estão saturadas com cada polímero, ou seja, todo o volume está ocupado pelas moléculas dos dois polímeros e da água de hidratação; a concentração de cada polímero em cada fase é determinada pela quantidade de moléculas de cada polímero ajustado no volume da fase.

A teoria geométrica estatística aplicada em sistemas polímero-polímero considera as seguintes hipóteses: as moléculas da mesma espécie estão distribuídas randomicamente na fase homogênea; a estrutura da solução está geometricamente saturada em termos de tamanho e forma de todas as moléculas do sistema; a existência de interações moleculares

não muda a natureza da distribuição molecular. A formação das duas fases é explicada da seguinte forma: na situação monofásica, as moléculas do soluto estão separadas e as moléculas adicionais de soluto ainda podem ser inseridas no espaço livre que existe. No ponto de separação de fase, as moléculas do soluto estão bem próximas umas das outras e a solução não aceita mais moléculas adicionais de soluto. Quando a concentração total do soluto aumenta, ocorre a formação de duas soluções geometricamente saturadas e estruturalmente diferentes (GUAN et al., 1994).

A teoria de Debye-Huckel é a mais adequada para os sistemas que contém soluções com cargas, como é o caso dos sistemas polímero-sal ou sistemas polímero-polímero com sais. Essa teoria leva em consideração a distribuição dos íons na solução para o cálculo de potencial químico e é mais utilizada em soluções com concentração iônica até 0,1 M, de onde se obtém ótimos resultados. À medida que a concentração iônica aumenta, o desvio entre os resultados teóricos e experimentais aumenta. Isso ocorre porque a teoria é precisa apenas para soluções diluídas, onde o comportamento eletrostático domina. Em soluções concentradas, o comportamento eletrostático é reduzido devido à presença de muitos íons que tendem a isolar as cargas eletrostáticas entre si (CABEZAS Jr, 1996).

O modelo virial de Pitzer é um modelo que pode ser aplicado com sucesso em sistemas polímero-sal. Ele utiliza o excesso de energia livre de Gibbs nos sistemas polímero-sal, combinando os parâmetros eletrostáticos com a equação virial. Esse modelo é uma extensão do modelo de Debye-Huckel, pois além das interações eletrostáticas, considera-se o efeito da força iônica. Com a utilização do termo da equação virial, o modelo leva em consideração também os solutos não-eletrólitos, como é o caso dos polímeros, o que faz com que ele se adapte melhor aos sistemas polímero-sal (WU et al., 1996).

#### **2.4.3.1. Tempo de Separação das Fases**

O tempo de separação das fases após a mistura dos componentes depende do tipo de sistema. Sistemas contendo PEG/sal possuem um tempo de separação das fases muito menor que os sistemas PEG/dextrana devido à densidade e viscosidade do sistema. Em sistemas dextrana/ficoll, o tempo varia de 1 a 6 horas pela ação da gravidade, enquanto em sistemas PEG/dextrana esse valor cai para 5 a 30 minutos, dependendo da concentração e

do peso molecular dos polímeros. Nos sistemas PEG/fosfato, o tempo de separação entre as fases é inferior a 5 minutos (COIMBRA, 1995).

Outro fator que também influencia o tempo de separação é a velocidade de coalescência das pequenas bolhas que se formam durante a agitação. Quando se agita um sistema de fases de maneira a uniformizá-lo, inicialmente ocorre a formação de pequenas regiões ricas em cada componente. Com o tempo, essas regiões aumentam e separam-se em duas regiões distintas (BAMBERGER et al, 1985).

A posição em relação ao ponto crítico também exerce influência no tempo de separação das fases. Nos sistemas próximos ao ponto crítico, o tempo de separação é maior devido a uma pequena diferença de densidade. Já no caso dos sistemas muito distantes do ponto crítico, a viscosidade aumenta devido ao aumento da concentração do polímero, tornando a separação de fases mais lenta.

#### **2.4.3.2. Fatores que Influenciam no Sistema de Fases**

Os principais fatores que influenciam no sistema de fases e conseqüentemente alteram o diagrama de fases são: peso molecular do polímero, concentração dos componentes do sistema e temperatura.

Quanto maior o peso molecular do polímero, menor a concentração necessária para a formação de duas fases. Isso significa que a curva binodal desloca-se no sentido da região monofásica à medida que o peso molecular do polímero aumenta. Para um sistema polímero-polímero (PEG/dextrana, por exemplo) a curva binodal torna-se cada vez mais assimétrica a medida que a diferença entre os pesos moleculares dos polímeros aumenta. O peso molecular do polímero afeta também o tempo de separação das fases, mas tal problema pode ser minimizado pela centrifugação do sistema após a mistura das fases (ALBERTSSON, 1986, ALBERTSSON et al., 1994). A massa molecular afeta também o comprimento da linha de amarração, que tende a aumentar com o aumento da concentração dos polímeros (FORCINITI et al., 1991).

A concentração dos componentes do sistema pode afetar a viscosidade e a densidade do sistema, causando diferenças no tempo de separação das fases e na razão de volumes.

A temperatura causa influência no diagrama de fases, pois altera a composição das fases no equilíbrio, deslocando a curva binodal, e modificando também o

comprimento da linha de amarração. Em geral, o comprimento da linha de amarração diminui com o aumento de temperatura. O seu efeito varia de acordo com o tipo de sistema. No caso de sistemas PEG/dextrana, a formação das fases é facilitada em temperaturas baixas (menores que a ambiente) e para os sistemas PEG/fosfato, a situação é oposta, pois temperaturas mais altas e próximas do ambiente facilitam a separação entre as fases. Quando o sistema está próximo ao ponto crítico, ele é mais instável devido ao deslocamento da curva binodal, podendo atingir mais facilmente a região monofásica. O aumento da temperatura do sistema causa ainda, em um sistema PEG/sal, aumento na concentração de PEG na fase polimérica e redução da sua concentração na fase salina. Esse efeito é uma das razões de se trabalhar com a temperatura do sistema fixa.

O pH e o tipo de cátion também são variáveis que podem influenciar no diagrama de fases. Diminuindo o valor do pH, as concentrações necessárias de polímero e sal de um sistema PEG/sal aumentam, deslocando a curva binodal para a direita. Esse fato pode ser explicado pelo aumento da razão  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ . Para o caso do fosfato, com a diminuição do pH, pois como o ânion monovalente é menos efetivo no “*salting out*” do PEG (fenômeno de expulsão devido ao tamanho do PEG), será necessária uma concentração maior dos componentes para formar o sistema bifásico. No caso do tipo de cátion, a substituição de fosfato de potássio desloca a curva binodal para a direita, e portanto a concentração dos componentes necessária para a formação do sistema de duas fases aumenta, sugerindo que o cátion sódio é mais eficiente que o cátion potássio para o efeito do “*salting out*” do PEG.

### 2.4.3. 3. Diagrama de Fases

A formação das duas fases aquosas depende da concentração dos componentes do sistema. O diagrama de fases mostra a região monofásica e bifásica de acordo com a concentração de cada componente expressa em % p/p.

A curva que separa a região de duas fases da região de uma fase é chamada curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada bifásica e abaixo monofásica.

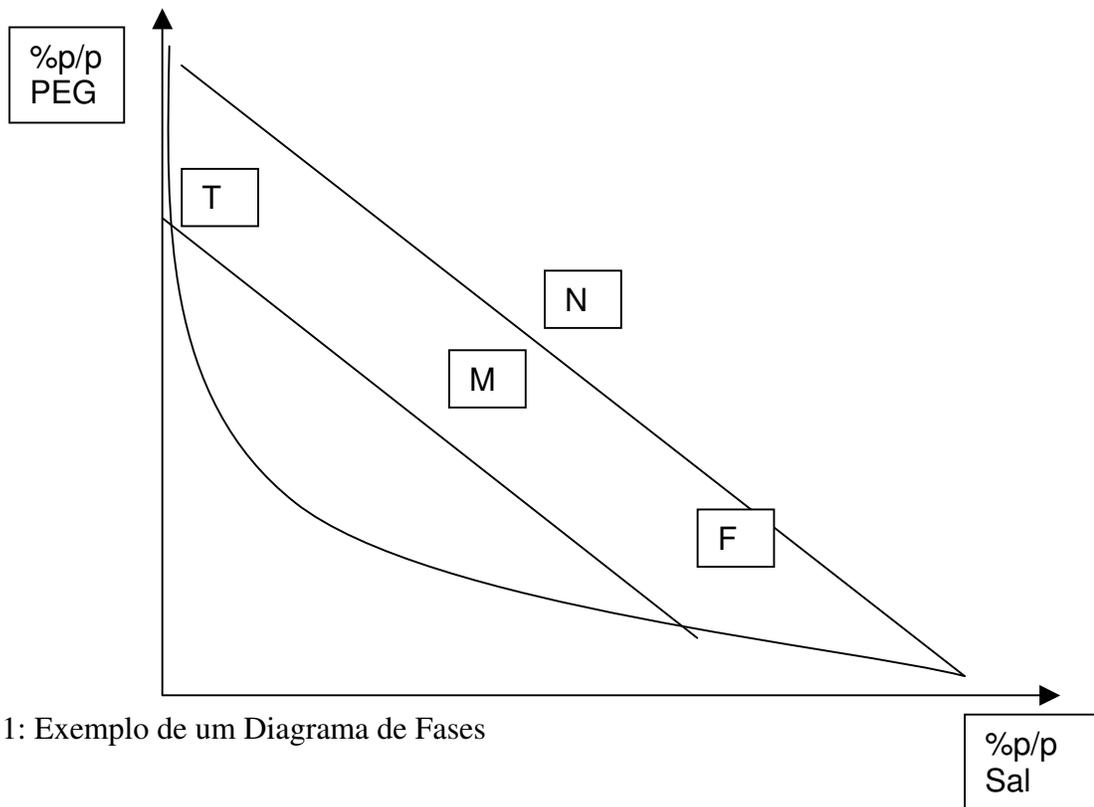


Figura 1: Exemplo de um Diagrama de Fases

A Figura 1 mostra um exemplo genérico de um diagrama de fases. A composição inicial do sistema é dada pelo ponto M e a composição final de cada fase após atingir o equilíbrio é dada pelos pontos T (fase superior ou de topo) e F (fase inferior ou de fundo). O segmento TMF é chamado de *tie-line* ou linha de amarração, e todos os sistemas cuja composição inicial está contida nessa linha possuem a mesma composição de fases após o equilíbrio, porém com diferentes razões de volumes entre as fases: superior e inferior. Já a linha de amarração determinada pelo ponto N define uma nova linha de amarração que aumentou proporcionalmente a concentração entre as fases em relação à linha de amarração determinada por M.

Como se pode observar, o fato de mudarmos da linha de amarração, definida pelo ponto M, para a linha definida pelo ponto N, variando proporcionalmente a concentração dos componentes das fases, não se obtém uma melhora significativa na recuperação e purificação da proteína em estudo.

#### 2.4.4. Fundamentos da Partição das Proteínas

Devido à atenção que vem sendo dada à produção de proteínas pela engenharia genética e o desenvolvimento da tecnologia de enzimas renovaram-se os interesses pelos processos de separação de proteínas e suas descrições quantitativas que servem de base para o “*scale up*”. Os fundamentos de partição de biomoléculas entre as duas fases ainda não são totalmente compreendidos.

A tendência de separação de fases apresentada por dois polímeros, quando adicionados num solvente comum, ocorre porque a baixa concentração molar dos polímeros na solução (tipicamente menos que 0,05 M) leva a um pequeno ganho de entropia durante a mistura. Por outro lado, cadeias poliméricas têm uma área superficial por molécula maior do que compostos de baixo peso molecular, tanto que as energias de interação entre dois polímeros se sobrepõem à energia de Gibbs do sistema. Estes fatores levam à formação de duas fases em sistemas ternários polímero-polímero-água, em baixas concentrações de polímeros.

A modelagem quantitativa da partição de proteínas em sistemas de duas fases aquosas representa um complexo problema pelo fato do comportamento do sistema depender de vários fatores, tais quais: tamanho da molécula, conformação, estrutura da superfície, interações de polímeros com as cadeias de proteínas e com diferentes sais, interações polímero-polímero, sal-proteína, proteína-proteína e, quando usados, as interações dos ligantes com os outros componentes presentes. Estudos empíricos com sistemas de duas fases aquosas mostraram que a distribuição da proteína é função de diversos fatores, como ( BASKIR et al. , 1989):

- tipo dos polímeros que formam as fases: peso molecular médio, distribuição do peso molecular, modificações químicas poliméricas.
- composição das fases: comprimento da linha de amarração, tipos de íons presentes ou adicionados ao sistema, força iônica.
- biomolécula: tamanho, carga, propriedades superficiais, concentração.
- pH e temperatura.

---

As condições adequadas para a partição devem ser encontradas experimentalmente devido à interdependência dos fatores citados anteriormente.

#### **2.4.4.1. Coeficiente de Partição**

O coeficiente de partição  $K$  é uma grandeza que representa a relação de concentração da substância de interesse na fase superior e inferior depois de atingido o equilíbrio:

$$K = C_T / C_F \quad \text{equação 1}$$

Onde:

$C_T$  é a concentração da substância de interesse na fase superior no equilíbrio

$C_F$  é a concentração da substância de interesse na fase inferior no equilíbrio.

O  $K$  é uma variável que mede a eficiência do processo de separação da substância de interesse pois mostra a sua distribuição nas duas fases aquosas. Pode ser calculado tanto para a substância de interesse como para os contaminantes ou proteínas totais presentes na amostra, podendo-se comparar estes valores. O que se deseja é que os dois coeficientes tenham uma ordem de grandeza bem distinta entre si. Como os sistemas em duas fases aquosas são aplicados aos processos de separação em biotecnologia, geralmente as substâncias de interesse são produtos biotecnológicos, principalmente proteínas e enzimas, às quais normalmente o  $K$  está associado.

Diversos tipos de interações podem ocorrer entre as substâncias de interesse e os componentes do sistema, tais como: interações de cargas, interações entre as pontes de hidrogênio, força de van der Waals e interações hidrofóbicas. Portanto existe uma série de fatores que podem influir na eficiência da partição (ALBERTSSON, 1986).

Nos sistemas de duas fases aquosas, os pigmentos têm preferência pela fase superior, pois são substâncias hidrofóbicas (LAHORE et al., 1995, HUSTEDT et al., 1985).

#### **2.4.4.2. Influência do Peso Molecular do Polímero e da Proteína no Coeficiente de Partição**

O peso molecular do polímero influencia o valor de  $K$ . Em um sistema PEG/sal, se o peso molecular do PEG for elevado, a partição da proteína será mais favorável à fase salina. Caso o peso molecular do PEG seja baixo, ocorrerá o oposto, sendo a partição

favorável à fase polimérica. O mesmo ocorre nos sistemas PEG/dextrana: se o peso molecular do PEG for elevado e o da dextrana for baixo, a partição será favorável à fase contendo dextrana. Isso ocorre provavelmente devido ao aumento do efeito do volume excluído que ocorre na fase PEG. Esse efeito é menor para substâncias de baixo peso molecular.

O peso molecular da substância a ser separada também influencia em K, pois quanto maior for a molécula, maior será a área de contato que interage com os componentes do sistema e, de acordo com as características da molécula e com o tipo de interação, ela será mais favorável a uma das fases. Esse fator é muito importante quando se deseja separar duas substâncias com pesos moleculares muito diferentes (JOHANSSON, 1994; ALBERTSSON, 1986; YANG et al., 1994).

O K depende também do peso molecular da proteína. Ele diminui com aumento do peso molecular e a magnitude dessa diminuição é maior para PEG com baixo peso molecular e tende a ficar estável para PEG com alto peso molecular (BAMBERGER et al., 1985, ALBERTSSON, 1986, FORCINITI et al., 1991). O tipo de proteína também influi no valor de K, porque as proteínas são macromoléculas polieletrólitas que carregam cargas quando estão em soluções aquosas. As cargas dependem da composição, da seqüência de aminoácidos, e também das propriedades da solução aquosa, como o pH e a concentração dos solutos (SCHLUCK et al., 1995).

#### **2.4.4. 3. Influência do pH do Sistema no Coeficiente de Partição**

Outro fator importante que influencia o K é o pH do sistema. Alterando o pH, ocorrem mudanças na distribuição de cargas da proteína. Em baixos valores de pH ocorre o aumento da carga positiva e em valores altos de pH, da carga negativa. Trabalhando-se em um valor de pH próximo ao ponto isoelétrico (pI), onde a somatória de cargas da proteína é praticamente nula, existirá apenas o efeito do tamanho e concentração do polímero e do tamanho e composição da superfície da proteína, considerando-se apenas os efeitos eletrostáticos (FORCINITI et al., 1991).

Na partição da cutinase, o K aumenta com o aumento do pH devido ao deslocamento da curva binodal. Além disso, aumentando o pH, a concentração do ânion  $\text{HPO}_4^{2-}$  aumenta em relação ao ânion  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , o que aumenta o efeito do 'salting out' fazendo com que a cutinase migre para a fase PEG (SEBASTIÃO et al., 1994)

#### **2.4.4.4 Influência das Interações entre a Proteína e o Sistema de Fases no Coeficiente de Partição**

Para o entendimento da influência de alguns fatores em  $K$ , é importante compreender o que é solubilidade de proteínas. Uma proteína apresenta uma superfície formada por regiões carregadas positivamente e negativamente, além de possuir regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. A distribuição dessas regiões depende do tipo de proteína. A solubilidade da proteína é determinada pelas interações entre tais regiões e o solvente que está presente no meio onde ela está contida. A solubilidade depende, portanto, de fatores termodinâmicos que favorecem ou não a sua solubilidade no solvente. O aumento da proporção de zonas hidrófobas na superfície da proteína resulta no aumento da afinidade a solventes apolares, como é o caso do PEG, fazendo com que esta permaneça na fase superior.

A solubilidade das proteínas nas soluções de PEG depende da interação hidrofóbica entre a proteína e o grupo etileno do PEG. Isso pode explicar a alta tendência das proteínas hidrófobas de se deslocarem para a fase superior rica em PEG. Neste caso, o PEG tende a interagir fortemente com as regiões apolares da proteína (SCHMIDT et al., 1996).

#### **2.4.4.5. Influência da Concentração dos Componentes do Sistema no Coeficiente de Partição**

A concentração dos componentes do sistema e, portanto, o comprimento da linha de amarração, também afetam o  $K$ . Em sistemas próximos ao ponto crítico, as proteínas em geral apresentam uma partição igual entre as duas fases, portanto o valor de  $K$  é igual a 1. Com o aumento da concentração dos componentes, que corresponde a um aumento no comprimento da linha de amarração, o valor de  $K$  será maior ou menor que 1 dependendo do tipo de proteína. Existem exceções a essa regra, podendo ocorrer valores de  $K$  diferentes de 1 para sistemas próximos ao ponto crítico, ou  $K$  pode aumentar com o aumento da concentração dos componentes até um máximo e depois diminuir. Para o caso de células ou particulados, o  $K$  é maior para os sistemas próximos ao ponto crítico. O efeito do comprimento da linha de amarração em  $K$  é maior em proteínas com alto peso molecular. Além disso, para um sistema PEG/sal, um aumento no comprimento da linha de amarração leva a um aumento da concentração de sal na fase inferior e a um valor praticamente

---

constante na fase superior, favorecendo o efeito do “salting out” da fase rica em sal para a fase rica em PEG (BAMBERGER et al., 1985, ALBERTSSON, 1986, MINAMI, 1997).

#### **2.4.4.6. Influência da Concentração de Proteínas no Coeficiente de Partição**

O K depende também da concentração da proteína presente na amostra. Para determinar seu valor é importante trabalhar com concentrações não muito altas de proteínas (de preferência menores que 1g/L), pois essas concentrações podem provocar a precipitação da proteína devido a presença de PEG (SCHMIDT et al, 1996).

A concentração de proteínas também é importante perto do ponto crítico, pois ao se adicionar uma pequena quantidade de proteína em um sistema próximo ao ponto crítico, o diagrama de fases pode modificar-se deslocando a curva binodal, como ocorre quando adicionamos uma pequena quantidade de água. Com isso, o valor de K poderá mudar (MINAMI, 1997). Quando o sistema está afastado do ponto crítico, não ocorre deslocamento da curva binodal para concentrações muito baixas de proteína, pois a composição das fases praticamente não se modifica com a adição de proteína. Porém, para altas concentrações pode haver influência na formação das fases que provoca redistribuição dos componentes do sistema, modificando o diagrama de fases e, conseqüentemente, o valor de K (GUAN et al, 1994).

#### **2.4.4. 7. Modelagem Matemática do Coeficiente de Partição**

Como o valor de K depende de diversos fatores, o desenvolvimento de um modelo para predizê-lo torna-se específico para um tipo de sistema ou substância. Existem vários trabalhos para o desenvolvimento de equações que possam prever o valor de K, mas que são específicas (ASENJO et al., 1994; EITEMAN et al., 1994).

Segundo ALBERTSSON (1986), pode existir, na partição de substâncias, cinco fatores diferentes que podem atuar separadamente (predominância de um fator em relação aos outros) ou em conjunto de acordo com o tipo de substância e do sistema de fases. São eles:

- Fator do tamanho, que existe quando a partição depende do tamanho da molécula ou da área superficial das partículas;
- Fator eletroquímico, que surge quando o potencial elétrico existente entre as fases do sistema é usado para separar as moléculas de acordo com a sua carga elétrica;

- Fator de afinidade hidrofóbica, que é a utilização das propriedades hidrofóbicas do sistema de fase para separar as moléculas em função da sua hidrofobicidade;
- Fator de afinidade bioespecífica, que utiliza a afinidade entre os locais da molécula como ligantes do polímero para a separação;
- Fator de conformação, que é considerado quando a conformação da molécula é o fator predominante.

Esses fatores podem ser agrupados na seguinte equação:

$$\ln K = \ln K^0 + \ln K_{eletro} + \ln K_{bioesp} + \ln K_{tam} + \ln K_{conf}$$

Onde:

$K_{eletro}$  é o fator eletroquímico;

$K_{bioesp}$  é o fator de afinidade bioespecífica;

$K_{tam}$  é o fato do tamanho;

$K_{conf}$  é o fator de conformação;

$K^0$  são os outros fatores que podem causar influência em  $K$ .

## 2.5. Planejamento Fatorial

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que vem sendo utilizada com muita frequência em trabalhos experimentais. Consiste na realização de um estudo sobre um fenômeno, que possua muitas variáveis que precisem ser analisadas de maneira organizada, a fim de delinear um caminho que conduza ao objetivo planejado utilizando-se de um número mínimo de experimentos.

Por esta técnica é possível constatar quais são as variáveis de maior importância para os resultados esperados no processo, a influência individual de cada uma delas e as interações que estas variáveis possuem entre si, concernente a resposta global do fenômeno. Quando rigorosamente aplicado, o método gera a possibilidade de avaliar os erros experimentais e de regressão e a modelagem matemática empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas, caracterizando o fenômeno. BRUNS et al (1996), faz uma descrição detalhada do método.

---

### 3. INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

#### 3.1. Tecnologia e Inovação

Uma das características da sociedade moderna é sua enorme permeabilidade à mudança. Mas quando transformada em padrão cultural, a mudança adquire rumo vertiginoso e a adaptação ao futuro passa a ser um dos principais problemas do presente (HABER, 2004).

A situação é mais grave no mundo dos negócios, onde evoluções acontecem em ondas sucessivas, sem tempo para que consolidemos o aprendizado de que são portadoras.

Segundo BATEMAN; SNELL (1998), tecnologia é a comercialização da ciência. É a aplicação sistemática do conhecimento científico a um novo produto, processo ou serviço. Para BULGERMAN; MAIDIQUE (1998), tecnologia refere-se ao conhecimento, saber, habilidades e artefatos que podem ser usados para desenvolver um novo produto, serviço, sistema de produção e sistema de entrega.

O conhecimento científico é resultado da pesquisa científica básica e envolve geralmente novos conhecimentos de natureza física, química ou biológica. O acúmulo de conhecimento resultante da pesquisa forma o substrato para as descobertas que, através do desenvolvimento tecnológico podem ou não se transformar em novos produtos, processos ou serviços. A essa transformação, dá-se o nome de inovação.

Segundo BATEMAN, SNELL (1998), inovação é uma mudança na tecnologia – um abandono nas maneiras anteriores de fazermos algo. Existem dois tipos fundamentais de inovação: inovação de produtos e inovação de processo.

O aumento na utilização de inovações vem aumentado substancialmente e justifica-se por ser esta uma forma de obter vantagem competitiva e a mais segura abordagem para defender posições estratégicas (HABER, 2004). Porém, nem sempre as inovações trazem bons resultados. Muitas inovações falham devido à cultura e rotina das empresas, a estruturas inadequadas e avaliações equivocadas (TIDD; BESSANT; PAVITT, 1997).

Quando o império comunista desmoronou, no começo dos anos 90, alguns países do bloco soviético, especialmente a antiga Alemanha Oriental, apresentavam indicadores sociais incomparáveis aos de países ocidentais avançados. O grande abismo a dividir os

---

dois mundos era o tecnológico, em especial a capacidade de inovação. O lado ocidental estava prestes a entrar em uma fase vibrante que resultaria na popularização do computador pessoal e na universalização da internet. O lado comunista mergulhara na estagnação criativa. A tensão produzida por esses extremos seria uma das razões do colapso do mundo comunista. Desde então, a incapacidade de inovar continua sendo fator determinante para o desmoronamento de impérios – não mais os políticos, mas os empresariais. "A única fonte de lucro, a única razão para investir em uma empresa é sua capacidade de inovar e se diferenciar", resume o americano JEFFREY IMMELT, o principal executivo da General Electric (GE), a maior companhia do mundo em valor de mercado (370 bilhões de dólares) e uma das mais criativas.

### **3.2. Desenvolvimento de Produtos**

Anteriormente aos fenômenos da globalização, informática e internet que deram suporte a disseminação de informação e um maior acirramento de concorrência, novos produtos levavam anos para serem planejados e desenvolvidos, eram padronizados e produzidos em massa. Os ciclos de vida dos produtos eram medidos em décadas e os processos produtivos utilizavam equipamentos dedicados a produção exclusiva destes produtos previamente padronizados. A economia em grande escala propiciava a redução de custo. Porém, para os consumidores deste novo século, há a necessidade eminente do desenvolvimento de novos produtos.

Segundo HABER (2004) o desenvolvimento de produtos constitui, hoje, uma corrida cujo objetivo é tornar-se o primeiro a lançar produtos inovadores, com ciclos de vida muitas vezes medidos em meses.

Em análise realizada pela economista Mariana Rebouças, responsável pela Pintec, do IBGE: "A pesquisa indica uma mudança no patamar da competitividade da indústria brasileira. Em vez de concentrar todo o esforço em cortar custos e alterar processos de produção, a tendência é ganhar mercado diferenciando produtos", diz. "O fato de as pequenas empresas terem puxado a taxa de inovação para cima, mesmo que preponderantemente copiando produtos já existentes no mercado, mostra que a base da pirâmide da indústria está brigando para se renovar". Na verdade, a criação de produtos e processos industriais novos no mercado nacional caiu entre 2001 e 2003 em relação ao período de 1998 a 2001 (NUCCI ET ALL, 2005)

A história econômica recente está crivada de vítimas da incapacidade de criar. Em certos segmentos da economia, como o de tecnologia digital, a produção de riqueza flui diretamente da inovação radical – e não mais simplesmente do aperfeiçoamento de técnicas e produtos já conhecidos. Há muito o termo inovação deixou de significar um estalo de gênio que produz um item campeão. Tornou-se um conceito multidimensional, que inclui gestão, distribuição, marketing, design – e, portanto, saiu do gueto da tecnologia para ser o ingrediente vital para o crescimento dos mais diversos setores econômicos.

Qualquer que seja um novo produto, ele tem um ciclo de vida, que genericamente pode ser considerado uniforme para os mais diversos produtos, variando na duração dos estágios.

A análise da Figura 2 mostra a divisão do ciclo de vida em quatro estágios:

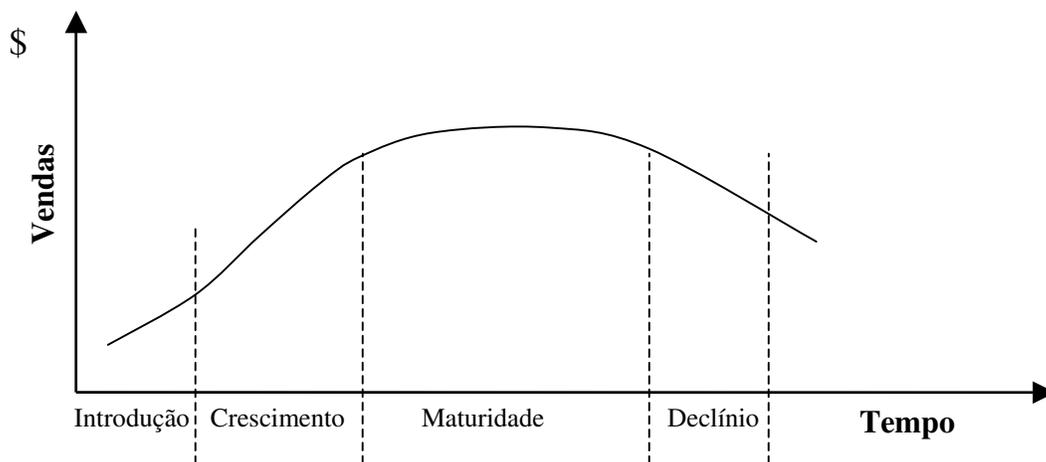


Figura 2 : Ciclo de vida de um produto. Fonte: MARTINS E LAUGENI,2003.

Introdução – período de crescimento lento das vendas à medida que o produto vai sendo introduzido no mercado. O lucro é inexistente porque as despesas de lançamento são muito grandes.

Crescimento – período de rápida aceitação do mercado e melhoria substancial nos lucros.

Maturidade – período de redução do crescimento de vendas porque o produto foi aceito pela maioria dos compradores potenciais. O lucro estabiliza ou entra em declínio em

---

função do aumento de despesas de Marketing para defender o produto contra a concorrência.

Declínio – período em que as vendas mostram forte queda e o lucro desaparece.

### **3.3. Liderança Tecnológica**

As inovações em processos podem ser sofisticadas demais para que possam ser implementadas com sucesso e as inovações envolvem riscos, pois podem encontrar pouca demanda de mercado (WRIGHT; KROLL; PARNELL, 2000).

O lançamento de uma inovação tecnológica implica a criação de uma novidade, que contém, normalmente, novos elementos que ainda não são completamente dominados e sobre os quais paira enorme incerteza (OLAVE; AMATO NETO, 2001).

Incerteza significa que as informações que o administrador possui não são suficientes para conhecer as conseqüências das ações e o risco existe quando a probabilidade de uma ação ser bem sucedida é menor que 100% (BATEMAN; SNELL, 1998).

Segundo FREITAS (1996), os riscos que uma inovação apresenta são, basicamente de dois tipos: os riscos resultantes da concorrência, dos processos de produção e das mudanças do mercado e os riscos resultantes dos erros de gestão.

A incerteza resultante da concorrência é inevitável quando existe grande concorrência no mercado, pois existem situações em que o mercado é tão vasto que pode absorver a produção de várias empresas, mas pode, algumas vezes, saturar-se rapidamente.

A incerteza resultante do processo de produção ocorre quando um produto que pareça promissor em escala de laboratório pode revelar-se inviável devido a baixos rendimentos, pouca confiabilidade, conquista de mercado etc.

A incerteza resultante do mercado ocorre quando a intenção de compra identificada no estudo de mercado revela-se diferente da decisão de compra após o lançamento. Muitas vezes, a demora no lançamento dos produtos pode comprometer o resultado.

O laboratório Aché lançou em junho de 2005 o primeiro medicamento fitoterápico criado no Brasil com matéria-prima nacional. A companhia gastou 15 milhões de reais no desenvolvimento do produto. "Para nós é um investimento grande, mas a única forma de a

---

indústria brasileira deixar de ser importadora é sendo inovadora", diz o diretor médico do laboratório, José Roberto Lazzarini. O princípio ativo do remédio é uma erva da Mata Atlântica, a *Cordia verbenacea*, ou erva-baleeira. Com ela, foi desenvolvida uma pomada antiinflamatória. O mercado de fitoterápicos movimenta 21,7 bilhões de dólares por ano no mundo, ou 4,5% do setor farmacêutico. Com a nova pomada, o Aché quer começar a exportar. O laboratório fatura 680 milhões de reais por ano e investe em pesquisa 10 milhões de reais – 1,4% do total (NUCCI et al, 2005).

Há também, segundo HABER (2004), a incerteza resultante dos erros de gestão que ocorrem devido a interpretação das tendências de mercado, à concepção do novo produto, a erros na concepção da patente e etc.

O que torna a liderança tecnológica atraente é o potencial de lucros altos e as vantagens do pioneirismo na adoção da nova tecnologia. Quando a empresa adquire habilidade de continuar inovando com velocidade suficiente, essa vantagem competitiva pode ser prolongada.

A maioria dos estudos indica que a empresa pioneira de mercado obtém mais vantagem, pois pesquisas têm mostrado que os consumidores, freqüentemente, preferem marcas pioneiras porque a experimentaram e gostaram (KOTLER, 1998).

Contudo, a inovação tecnológica nem sempre conduz a vantagens imediatas e altos lucros. A Tabela 5 mostra as vantagens e desvantagens da inovação tecnológica.

VANTAGENS	DESVANTAGENS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ser o primeiro a adotar a nova tecnologia</li> <li>• Pouca ou nenhuma concorrência</li> <li>• Maior Eficiência</li> <li>• Maiores margens de lucro</li> <li>• Reputação de Inovador</li> <li>• Estabelecer barreiras de entrada</li> <li>• Ocupar os melhores nichos do mercado</li> <li>• Oportunidades de aprender</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maiores Riscos</li> <li>• Custo de desenvolvimento de mercado e educação do consumidor</li> <li>• Custos de infra-estrutura</li> <li>• Custos de aprendizagem e eliminação de defeitos</li> <li>• Possível canibalização dos produtos existentes</li> <li>• Vantagens da liderança tecnológica</li> </ul>

Tabela 5: Vantagens e desvantagens da liderança tecnológica

Fonte: BATEMAN; SNELL (1998), adaptado por HABER (2004).

O principal atrativo de ser o primeiro a adotar a nova tecnologia é o potencial de lucratividade, pois a inexistência ou pouca concorrência pode possibilitar, inicialmente, a fixação de um preço de venda mais alto. Normalmente, a liderança tecnológica aumenta a eficiência em relação aos concorrentes e isso alcança uma vantagem de custo, podendo, se necessário, fixar preços de venda mais baixos. Patentes e outras barreiras institucionais podem ser utilizadas para bloquear os concorrentes e manter a liderança tecnológica. O lançamento inicial do produto possibilita a ocupação dos melhores nichos de mercado. Preços e lucros maiores podem pagar os custos de desenvolvimento de novas tecnologias. A reputação de um ser inovador pode criar uma vantagem competitiva contínua e ainda influenciar outros produtos da empresa (HABER, 2004). O aprendizado que a inovação traz à empresa é muito significativo, pois enquanto os concorrentes podem ser capazes de copiar ou adotar uma nova tecnologia, as pequenas melhorias que a liderança tecnológica traz são difíceis de alcançar.

BUZZEL; WISERMA (1981) constataram que as empresas que apresentam ganhos de mercado superaram seus concorrentes com o lançamento de produtos novos em seu portfólio ou com o aumento de produtos em suas linhas tradicionais.

---

### 3.4. A Adoção de uma Nova Tecnologia

A dimensão mais importante em uma tecnologia é seu valor competitivo, uma vez que uma nova tecnologia pode modificar completamente as regras da concorrência dentro de um setor industrial. Os problemas que se apresentam são: qual a tecnologia a ser utilizada, qual seu custo, qual seu benefício e quando adotá-la.

As tecnologias atuais podem ser divididas em quatro categorias (BATEMAN; SNELL, 1998):

- **TECNOLOGIAS DE BASE:** são aquelas comuns. Elas podem oferecer pequena vantagem competitiva.
- **TECNOLOGIAS CHAVE:** são eficazes e fornecem uma vantagem estratégica porque nem todos as utilizam. O conhecimento e a disseminação dessas tecnologias são limitados.
- **TECNOLOGIAS JOVENS:** ainda não tiveram seu valor provado, mas possuem potencial de alterar as regras da competição, por fornecerem vantagens significativas.
- **TECNOLOGIAS EMERGENTES:** estão ainda em desenvolvimento e não estão comprovadas.

Uma organização deve avaliar sua necessidade tecnológica através da análise das tecnologias atuais utilizando-se do *benchmarking* e do *scanning* (BATEMAN; SNELL, 1998).

O *benchmarking* é uma técnica largamente utilizada no campo empresarial e foca o que está sendo feito atualmente, basicamente as tecnologias chaves e algumas tecnologias jovens. *Benchmarking* é o processo de comparar as práticas de uma organização com as de outra organização. A possibilidade de se realizar um *benchmarking* de tecnologias pode variar em função do setor que a empresa atua. Em alguns casos, o caminho mais utilizado é o *benchmarking* internacional, ou seja, a importação de novos processos tecnológicos.

O *scanning* é pesquisa de fontes de novas tecnologias. O seu foco são as tecnologias jovens e tecnologias emergentes

---

As fontes de fornecimento de tecnologia são muito diferentes, dependendo do setor em que a empresa atua e incluem fornecedores, fabricantes, usuários, outros setores industriais, universidades e governo.

As grandes empresas competirão pelas novas idéias geradas pelas pequenas empresas e estas precisarão do capital, dos recursos de produção e distribuição das grandes (HABER, 2004). Para DAUSCHA (2005), torna-se cada vez mais necessário aproximar os empresários das instituições de pesquisa do país, de forma a criar um ambiente inovador. Segundo ele, as empresas com mais de 500 funcionários são as que apresentam as maiores taxas de investimento em P&D. DAUSCHA (2005) acredita que a inovação nas empresas menores vai ocorrer no momento em que elas tiverem uma visão mais abrangente do mercado e conseguirem evoluir nas técnicas de gestão industrial e de fabricação. “Para isso, elas precisam ser ajudadas”.

Em média, os empresários que trabalham com pesquisa e desenvolvimento não aplicam mais que 0,64% de seu faturamento em inovação, seja na melhoria de seus produtos ou na compra de equipamentos.

Os dados foram apresentados por Ronald Martin Dauscha, presidente da Associação Nacional de Pesquisa, Desenvolvimento e Engenharia das Empresas Inovadoras (ANPEI).

A Lei de Inovação representa um grande avanço no setor, pois permite às empresas inovadoras abaterem no Imposto de Renda, por exemplo, 160% do total investido em pesquisa e desenvolvimento (P&D), podendo chegar a 200% caso apresentem, em seus quadros, mestres e doutores, além de produtos patenteados (DAUSCHA, 2005).

O custo de desenvolvimento interno de um produto novo pode alcançar valores muito elevados (KOTLER, 1998).

O meio ideal para uma empresa crescer mais rapidamente é a compra de tecnologia, principalmente se não se dispõe de recursos financeiros suficientes (HABER, 2004). Em políticas de compra de tecnologia, a atitude básica mais difundida é comprar o máximo de patentes e licenças, estejam ou não relacionadas com tecnologias de ponta. Esta atitude foi muito utilizada pelo Japão no início dos anos 70 e ainda persiste atualmente, pois 15% das suas inovações são baseadas em invenções estrangeiras. Na Grã Bretanha este número é de 12% e 7% nos Estados Unidos (VICO MAÑAS, 2001).

---

Ainda segundo VICO MAÑAS (2001), o processo de escolha de uma tecnologia no Brasil segue o processo utilizado em outros países, porém as empresas ainda não investem muito em desenvolvimento das próprias tecnologias, sendo mais usual a compra de tecnologia. Segundo DAUSCHA (2005), apenas 30% de todas as empresas brasileiras fazem algum tipo de inovação, sendo os setores de informática, eletrônico e químico os que mais inovam.

Admitindo-se que a inovação é fundamental para a capacidade competitiva das empresas em longo prazo e que uma parcela significativa das empresas têm consciência deste fato, DACORSO; YU (2000) questionam o motivo das empresas relutarem em se decidir pela inovação. Uma das razões, segundo MATHESON (1998), o fato deve-se a complexidade das decisões, pois afetam todo o ambiente do negócio e são particularmente difíceis, devido às muitas incertezas que os cercam.

Para CLEMEN (1996), a tomada de decisão na área de inovação é uma tarefa bastante difícil, pois depende de quatro fatores, basicamente:

- a) a própria complexidade do problema que envolve a decisão
- b) a incerteza a uma tomada de decisão
- c) a existência de múltiplos objetivos
- d) diferentes perspectivas do problema

## 4. CUSTOS

Contadores definem custos como um recurso sacrificado ou renunciado para conseguir um objetivo específico. Um custo normalmente é medido como a quantidade a ser paga para adquirir bens ou serviços. Um custo real (HORNGREN, 2004) é o custo incorrido em comparação a um custo orçado ou previsto.

Para dirigir suas decisões, os investidores querem saber quanto um determinado produto, processo ou serviço específico custa. Este produto é chamado de objeto de custo que pode ser considerada como qualquer elemento para o qual a medida de custos é desejada.

Segundo HORNGREN (2004) um sistema de custeio típico justifica custos em dois estágios básicos: acúmulo seguido por apropriação. O acúmulo é a coleta de dados, de alguma forma organizada, por meio de um sistema de contabilidade.

Para CHALOS (1992), os métodos de custeio padrão são comuns na fundamentação dos sistemas de controle das empresas. Porém, os sistemas não são estáticos e devem ser revisados e adequados de acordo com a produção e o ciclo de vida dos produtos. Além dos processos de melhoria contínua que visam reorientar as formas de trabalho, reduzindo assim seus custos.

O custo representa um sacrifício de recursos. O preço de cada item mede o sacrifício feito para adquiri-lo. Independente de ser pago imediatamente ou no futuro, o custo de um item é estabelecido pelo seu preço.

### 4.1. Custos Diretos e Custos Indiretos

Os custos diretos de um objeto de custo são relativos ao objeto de custo em particular e podem ser rastreados para aquele objeto de custo de forma economicamente viável. São relacionados diretamente ao objeto representando insumos fundamentais para a produção ou confecção do objeto.

O termo rastreamento de custos é usado para descrever a apropriação de custos diretos para o objeto de custo em particular (HORNGREN, 2004).

Os custos indiretos são relativos ao objeto de custo em particular, mas não podem ser rastreados de forma economicamente viável (HORNGREN, 2004). Os insumos que compõem os custos indiretos de fabricação são indispensáveis para a produção e

composição do produto, porém não acrescem valor direto ao objeto. São as atividades como a de supervisão que tem suas despesas relativas ao objeto, porque a supervisão é necessária para administrar a produção e a venda do objeto de custo. A supervisão pode ser considerada indireta, pois a atividade pode ser realizada em mais de um produto. Diferentemente do consumo de matéria-prima, um custo indireto apresenta maior dificuldade de rastreamento. O termo apropriação de custos é usado para descrever a distribuição dos custos indiretos para um objeto de custo em particular.

#### **4.1.1. Fatores que Afetam as Classificações de Custos Diretos Indiretos**

Vários fatores afetam a classificação de um custo como sendo direto ou indireto (HORNGREN 2004).

Quanto maior a quantia de um custo, mais provável é que seja economicamente viável rastrear aquele custo para um objeto em particular. Determinadas quantias destinadas a divulgação ou apresentação de um produto representam uma pequena parcela diante dos custos efetivos do objeto a ser fabricado.

Melhorias na tecnologia de coleta de informações e a velocidade de transmissão das mesmas estão fazendo com que seja possível considerar um número cada vez maior de custos como custos diretos. Segundo HORNGREN (2004) muitas peças de componentes tem um código de barra que pode ser escaneado em todos os pontos do processo de produção. Os códigos de barra podem ser lidos para um arquivo de custos de produção, da mesma maneira rápida e eficiente que os caixas de supermercado entram com o custo de cada item comprado por um cliente.

Classificar um custo como direto é mais fácil se a instalação de uma empresa (ou alguma parte dela) for usada exclusivamente para um objeto de custo específico, como um produto específico, ou um cliente em particular.

Sistemas de custeio registram os custos de recursos adquiridos e rastreiam como são então usados. O registro dos custos de recursos adquiridos e usados permite a observação do comportamento dos custos. Encontram-se dois tipos básicos de padrão de comportamento de custos em muitos sistemas contábeis: o custo variável muda no total em proporção às mudanças no nível relativo de atividade ou volume total. O custo fixo permanece inalterado no total por um dado período de tempo, apesar de mudanças amplas no nível de atividade ou volume total. Custos são definidos como sendo fixos ou variáveis

---

com respeito a um objeto de custo específico e por um dado período de tempo. Segundo HORNGREN (2004) as pesquisas práticas empresariais indicam que a identificação de um custo como variável ou fixo ajuda na previsão dos custos totais e na tomada de decisões administrativas.

CHALOS (1992), salienta que o sistema de custeio padrão tem sido deficiente nas três áreas de gerenciamento de custos: matéria-prima, produtos em processo e produtos acabados.

A qualidade da matéria prima afeta diretamente o custo do produto. Segundo CHALOS (1992) muitos estudos realizados nos Estados Unidos demonstram a grande quantidade de defeitos encontrados em componentes adquiridos de fornecedores europeus e japoneses mesmo as empresas americanas especificando os padrões de qualidade exigidos em seus contratos. Para minimizar os problemas os processos de inspeção de matéria prima são comumente utilizados adicionando um custo indireto à matéria-prima, insumo apropriado como custo direto.

O material em processo é custeado por diferentes índices. Alguns são focados por unidades equivalentes e outros ainda por produtos acabados por período. Os sistemas produtivos de tecnologia mais avançada como os de manufatura celular, resultam num maior rateio de custos indiretos dos materiais em processos entre os departamentos e ainda aumenta a qualidade, a flexibilidade e a velocidade de produção. As novas formas de produção têm influência importante no inventário e controle dos produtos em processos.

Uma forma importante, porém cansativa, de calcular o custo de bons produtos acabados, é o cálculo do custo por unidade de cada uma das famílias de produtos. São incluídos os tempos de ciclo de produção e os custos de material em processo são minimizados. A metodologia tradicional dos custos concentra-se muito mais nas variações de custo da matéria prima do que no controle dos custos gerados pelos produtos em processo. Esta metodologia gera uma subestimativa dos custos traçados por linha de produtos gerando diferentes níveis de qualidade nos produtos acabados. Com isso os produtos têm seu ciclo de vida reduzido e os custos com a obsolescência dos equipamentos aumenta. Como resultado, pode-se observar que os sistemas de custos são deficientes para adequar verdadeiramente os custos dos produtos acabados.

## 4.2. Fixação do Preço de Venda

É generalizada a idéia de que uma das finalidades da contabilidade de custos é o fornecimento do preço de venda.

Para administrar preços de venda, é necessário conhecer o custo do produto; porém essa informação, por si só, embora seja necessária, não é suficiente. Além do custo é preciso saber a elasticidade da demanda, os preços dos produtos concorrentes os preços de produtos substitutos ou similares, e tudo isso depende também do mercado em que a empresa atua, que pode ir desde o monopólio até a concorrência perfeita.

Segundo MARTINS (2003), o importante é que os sistemas de custos produzam informações úteis e consistentes com a filosofia da empresa, particularmente com a sua política de preços.

Considerando-se esses aspectos citados, os preços podem ser fixados: com base nos custos, com base no mercado ou numa combinação de ambos.

### 4.2.1. Formação de Preços com Base em Custos

Nesta forma de calcular preços – de dentro para fora -, o ponto de partida é o custo do bem ou serviço apurado, segundo os critérios de custos de fabricação. Sobre este custo agrega-se uma margem, denominada *markup*, que deve ser estimada para cobrir os gastos não incluídos no custo, os tributos e comissões incidentes sobre o preço e o lucro desejado pelos investidores (MARTINS, 2003).

Segundo BERNARDI (1998), o *markup* a utilizar será estruturado conforme a incidência de impostos, as despesas variáveis de venda, a inclusão de despesas operacionais e o lucro desejado de venda, observadas as circunstâncias e interesses mercadológicos e financeiros. O preço formulado com *markup* é um referencial a ser analisado e não mais uma imposição do mercado.

Numa situação bastante simples, MARTINS (2003), apresenta os seguintes dados:

- Custo unitário: \$8
- Despesas Gerais e Administrativas: (DGA): 10%
- Comissões dos Vendedores (COM): 5%
- Tributos (IMP): 20%

- Margem de lucro desejada (MLD) : 5%

O *markup* seria então a somatória destes itens e portanto seu total seria de 40% sobre o preço de venda bruto.

O preço de venda (PV) será o custo acrescido de 40% do PV

$$PV = \$8 + 0,4 PV$$

$$PV - 0,4PV = \$8$$

$$PV = \$13,33$$

Por este método o preço de venda seria fixado em \$13,33.

Esse preço seria, então, uma referência, sujeita a ajustes – para mais ou menos-de acordo com as condições de mercado e com as negociações específicas com cada cliente (MARTINS, 2003).

O preço, sendo um componente do composto mercadológico, é fundamental para a estratégia de vendas da empresa.

Assim, é muito importante que a empresa, uma vez definida sua política de vendas, considere o preço como fator competitivo em suas políticas, de modo atingir seus objetivos e isto está intimamente relacionado aos custos e a estruturação do *markup*. (BERNARDI, 2003)

### **4.3. ANÁLISE ECONÔMICA DE PROJETOS**

Tomando por base os dados técnicos dos processos desenvolvidos, partir-se-á para a análise de viabilidade econômica que essencialmente avalia os benefícios e custos dos projetos, reduzindo-os a uma medida comum. E tendo-se mais de uma alternativa econômica, há a necessidade de compará-las a fim de selecionarmos a mais conveniente para o problema em questão.

Se o problema for escolher um equipamento, deverá ser escolhido aquele que oferecer o menor custo.

Se o problema for selecionar um investimento, deverá ser escolhido aquele que oferecer maior rentabilidade. Quando se tratar de avaliação de custos, deverá ser escolhida a alternativa que apresenta menor custo (HIRSCHFELD, 2000).

Os principais métodos de análises de alternativas econômicas são:

1) Método do Valor Presente Líquido

Tem como finalidade determinar um valor no instante considerado inicial (data zero). Este valor é obtido utilizando a taxa de juros s mercado ou taxa mínima de atratividade.

2) Método do Valor Futuro Líquido

Tem por finalidade determinar um valor no instante considerado final, partindo-se de um fluxo de caixa. Para obter-se esse valor, utiliza-se a taxa de mercado ou taxa mínima de atratividade.

3) Método do Valor Uniforme Líquido

Quando se trata de um investimento que apresenta diferentes valores, podem-se transformar tais valores em uma série uniforme equivalente que auxiliará na análise de alternativas econômicas. Para a transformação dos valores é utilizada a taxa mínima de atratividade.

4) Método da Taxa de Retorno

Quando investimos em um bem, seja uma aplicação financeira ou um empreendimento, fazemo-lo, movidos pelo desejo de receber, em devolução, uma quantia que, em relação à quantia investida, constitui uma parcela porcentual denominada taxa de retorno. Quando esta parcela é superior à taxa mínima de atratividade o projeto é considerado vantajoso.

5) Método do Prazo de Retorno ou Prazo de Recuperação do Investimento

Fornece o número de períodos do fluxo de caixa, nos quais a somatória dos benefícios se iguala à somatória dos custos. É também denominado “*payback*”.

Esse método pode ser considerado de duas formas, com juros nulos e com juros reais. Para utilização deste método, desprezam-se os valores residuais do bem, existente no final da vida útil.

## 6) Método do Benefício-Custo

É empregado em maior escala na análise de obras públicas, onde o prazo de duração é geralmente muito grande e a conceituação de benefícios é, às vezes, mais delicada do que em investimentos privados. A relação benefício-custo (B/C) tem como finalidade única verificar se a alternativa analisada é viável ou não.

Benefícios são as avaliações específicas de receitas, faturamentos, dividendos e tudo mais que tende a beneficiar o empreendimento previsto. Os benefícios podem ser tangíveis ou intangíveis (HIRSCHFELD, 2000).

**Benefícios Tangíveis:** são aqueles que podem ser expressos em valores econômicos com relativa facilidade, visto seguirem um raciocínio simples e lógico em que todas as variáveis são determinadas com simplicidade.

**Benefícios Intangíveis:** São aqueles que não podem ser expressos em termos econômicos com relativa facilidade, visto suas determinações serem objetos de apreciações subjetivas que necessitam embasamentos bem estruturados para não serem refutados (HIRSCHFELD, 2000).

Segundo CHALOS (1992), os benefícios podem ser classificados em:

**Estratégicos:** Satisfação do cliente, penetração em novos mercados, desenvolvimento de uma tecnologia, transferência de tecnologia;

**Quantitativos:** rentabilidade, utilização da capacidade ociosa;

**Qualitativos:** reputação, estabilização da força de trabalho.

A mensuração destes benefícios é muito complexa, principalmente quando envolve tecnologias avançadas, tais como automação ou mudança de processos. (CHALOS, 1992; HABER, 2004)

Segundo Chalos (1992), alguns dos custos e benefícios podem ser facilmente identificáveis, tais como:

- Redução dos custos diretos de fabricação;
- Aumento dos custos indiretos de fabricação;
- Redução de estoques de material em processo;

- Redução dos tempos de parada de máquinas e conseqüente aumento da capacidade produtiva.

Porém, alguns custos ou benefícios, tais como reputação tecnológica, participação do mercado, inovação tecnológica, confiança no produto podem não ser mensuráveis na análise de investimento a ser realizado. Segundo HABER (2004), e CHALOS (1992), quanto mais avançada for a tecnologia, maior a dificuldade de se quantificar os custos.

Muitas empresas, quando decidem investir em tecnologia avançada, enfatizam mais os fatores qualitativos do que os quantitativos, mesmo que eles sejam valores difíceis de apurar (CHALOS, 1992).

#### **4.3.1. Avaliação de Projetos de Inovação Tecnológica**

Quando são analisados os investimentos em tecnologia avançada, devem ser considerados os aspectos quantitativos, qualitativos e estratégicos do investimento.

A análise de projetos de tecnologia avançada pode utilizar-se de outros métodos que suplementam a análise do valor presente líquido, pois há grande dificuldade em analisar matematicamente dados que medem diferentes atributos.

#### **4.3.2. Modelo de Decisão por Múltiplos Atributos ou de Pontuação**

É utilizado quando é necessário encontrar a correlação matemática de dados quantitativos, qualitativos e estratégicos não comparáveis. Segundo CHALOS (1992), este método é mais preciso que as técnicas de análise por custos e benefícios, pois atribui pesos relativos a todos os atributos de decisão.

Metodologia de Aplicação (HABER, 2004):

- Um conjunto de atributos estratégicos, qualitativos e quantitativos necessários para analisar o projeto é coletado.
- Cada atributo recebe um peso relativo baseado no sucesso da empresa no mercado, perfazendo um total de 100. Esse peso pode ser obtido através do consenso entre as pessoas chave dos departamentos envolvidos no processo;
- Atributos estratégicos, qualitativos e quantitativos devem receber um valor em uma escala pré-determinada, por exemplo, de 1 a 5;

- É incorporada a confiança ou certeza de que o projeto terá êxito. Esta incorporação é feita através da probabilidade, por análise subjetiva, ou estatística, de ser atingida a meta escolhida naquele atributo;
- Os resultados finais, obtidos através da somatória do produto das colunas (peso x valor x confiança) é a pontuação final do projeto.

Segundo HABER (2004) esse modelo é o mais apropriado para investimentos em tecnologia avançada, pois incorpora fatores qualitativos e estratégicos não capturados nos métodos tradicionais de análise financeira.

A Tabela 6 mostra um exemplo de aplicação de um modelo de pontuação para avaliação de projetos.

ATRIBUTO	PESO	VALOR	CONFIANÇA	PRODUTO
1. Estratégico				
Reputação tecnológica	12	4	1,0	48
Participação e mercado	10	2	0,8	16
Posição Competitiva	14	3	0,7	29
Inovação de Produtos	8	4	1,0	32
2. Quantitativo				
Valor Presente líquido	30	4	0,9	108
Prazo de retorno	10	2	0,8	16
3. Qualitativo				
Diversidade de produtos	4	4	1,0	16
Confiança do Produto	3	4	1,0	12
Tempo de resposta	3	1	1,0	3
Número de partes	4	0	0,8	0
Medidas em tempo real	2	5	0,9	9
Total	100			289

Tabela 6: Exemplo de aplicação de um modelo de pontuação para avaliação de projetos.

Fonte: HABER (2004)

Segundo HABER (2004), o método de Decisão por Múltiplos Atributos é um método que, em seu conceito, sintetiza razoavelmente vários outros métodos que são normalmente utilizados em análise de viabilidade econômica de projetos. É abrangente o suficiente para permitir uma visão geral de todos os fatores envolvidos na análise de viabilidade de projetos e aborda diferentes aspectos para a avaliação de projetos de inovação tecnológica. É utilizado quando existem diversos projetos entre os quais deve-se escolher em quais investir.

#### **4.4. Análise Linear de Equilíbrio**

A análise de equilíbrio tem como objetivo a verificação de um ponto em que duas alternativas, funções de um mesmo parâmetro e comparadas em idênticas condições de instantes e prazos, apresentam o mesmo valor. Tal ponto é chamado de ponto de equilíbrio (*breakeven point*).

Pela definição apresentada por HIRSCHFELD (2000), a análise de equilíbrio não se prende, somente a estudos de comparação entre receitas e despesas com a determinação do ponto em que ambos os valores são iguais e a partir do qual começa a haver lucro.

De forma geral, as análises que procuram determinar o ponto de equilíbrio consideram as duas linhas, representadas por duas equações lineares que devem representar o fluxo de caixa de cada uma das alternativas em estudo.

Na fase de planejamento, tais considerações retilíneas podem ser consideradas perfeitamente normais, HIRSCHFELD (2000), e virtude de informações mais detalhadas e confiáveis e que, eventualmente, poderiam demonstrar que aquelas linhas retilíneas poderiam não sê-las.

As conclusões obtidas a partir de uma análise linear de equilíbrio são bastante confiáveis e aceitáveis na fase de planejamento. Posteriormente, na fase de acompanhamento do desempenho, com os informes reais coletados, pode-se obter uma maior exatidão das curvaturas das linhas que se cruzam, apresentando então um ponto de equilíbrio que poderá não coincidir com aquele determinado na fase de planejamento, mas de forma significativamente próxima desde que não hajam grandes variações de mercado e que a análise dos custos tenha sido realizada com rigor. Os elementos então colhidos poderão fornecer outras conclusões que, igualmente, como na fase de planejamento, serão úteis para a tomada de novas decisões. (HIRSCHFELD, 2000)

##### **4.4.1. Ponto de Equilíbrio entre Receitas e Despesas**

De modo genérico, um fluxo de caixa apresenta as seguintes contribuições: investimento inicial, receitas operacionais, despesas operacionais e valores residuais dos equipamentos.

---

Não é escopo deste trabalho o aprofundamento específico na técnica da Contabilidade de Custos, onde as receitas e despesas podem ser classificadas de diversas maneiras.

A abordagem ater-se-á a classificação em que os custos, ou despesas são classificados em fixos e variáveis em função de determinadas premissas, cujos critérios utilizados podem, eventualmente, variar entre vários classificadores.

A premissa, em geral adotada, é a de custo fixo e variável quando seu valor, respectivamente, não aumenta em função de uma produção.

Como custos fixos podem ser citados: despesas administrativas, impostos e taxas fixas, aluguel, pesquisas seguros, propaganda, despesas de condomínio, encargos e salários.

Como exemplos de custos variáveis podem ser citados: direitos autorais de tecnologia, desperdícios, despesas com embalagens, manutenções, matéria prima de produtos vendidos e comissões de vendas.

Existem custos cujas classificações em fixos ou variáveis depende muito da sensibilidade da interpretação, ao se analisar o seu valor, tipo, tamanho ou outro elemento influente.

HIRSCHFELD (2000) afirma que nesta interpretação é que reside grande valor, pois a classificação certa das despesas fixas e variáveis pode determinar um preço de venda conveniente em determinadas situações excepcionais, quando for necessário estudar profundamente um preço especial a fim de não se perder a oportunidade comercial.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Engenharia Industrial - FEI. Foram utilizados abacaxis de variadas espécies adquiridos no mercado. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 5.1. Extração por Batelada.

#### 5.1.1. Preparo da Amostra

As amostras foram preparadas com abacaxi de diversos tipos, encontrados em mercados e, exceto a coroa, foram triturados e filtrados eliminando as fibras, e armazenados, à temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ . Para os ensaios as amostras foram descongeladas e utilizadas no mesmo dia. Caso a quantidade de amostra descongelada não fosse utilizada, era novamente congelada. A Figura 3 demonstra esquematicamente a rotina de preparação da amostra.

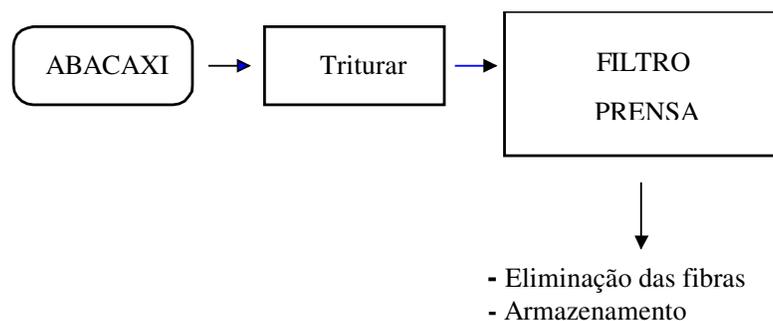


Figura 3: Preparo da amostra

### 5.1.2. Extração com Etanol

No início da pesquisa foram realizados ensaios para a avaliação qualitativa da capacidade hidrolítica da bromelina em gelatina sólida. O objetivo foi avaliar o volume de perfuração causado pela enzima presente em diferentes partes do abacaxi: suco do fruto, talo, coroa, folhas e casca, na presença e ausência de metabissulfito de potássio, verificando assim a sua atuação como ativador enzimático da bromelina. A Figura 4 descreve como foram realizados os testes:

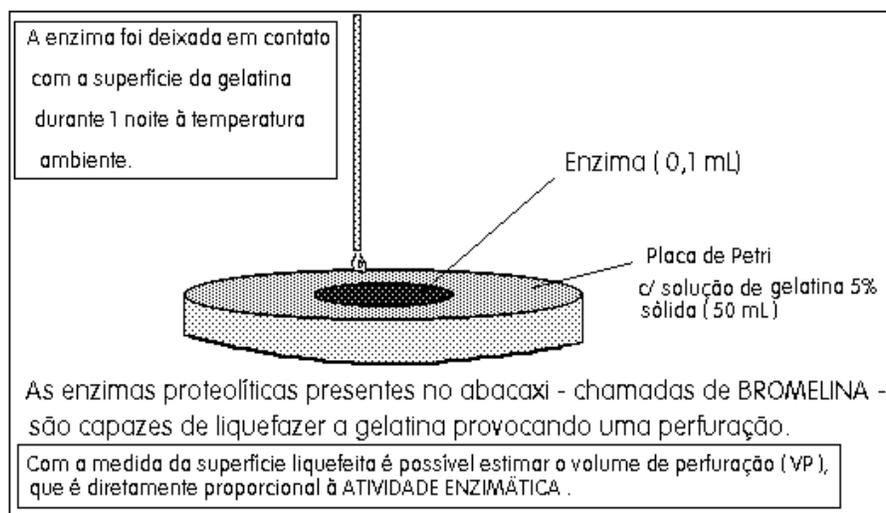


Figura 4: Descrição dos testes de liquefação da gelatina .

Durante a hidrólise da gelatina, a bromelina hidrolisa as proteínas em peptídeos, sendo que alguns podem chegar a aminoácidos. Para verificar a presença de aminoácidos na gelatina liquefeita foram realizados alguns testes com solução acética de ninidrina, que indica, após aquecimento uma cor violácea na presença de aminoácidos e peptídeos de cadeia curta.

O volume relativo de perfuração foi calculado considerando a perfuração de forma circular, medindo-se o diâmetro médio (média aritmética do maior e menor diâmetro) e a altura média de perfuração. A Tabela 7 mostra os resultados do volume de perfuração.

	VP (cm <sup>3</sup> ) com KHSO <sub>3</sub>	VP (cm <sup>3</sup> ) sem KHSO <sub>3</sub>
fruto	10,58	11,31
casca com fruto	4,42	4,95
casca com água	4,25	2,01
talo	3,65	2,83
coroa	1,09	0,82
folhas		0,42

Tabela 7: Resultados do volume de perfuração (VP), amostra com e sem bissulfito de potássio.

A Figura 5 demonstra graficamente os resultados do volume de perfuração da gelatina.

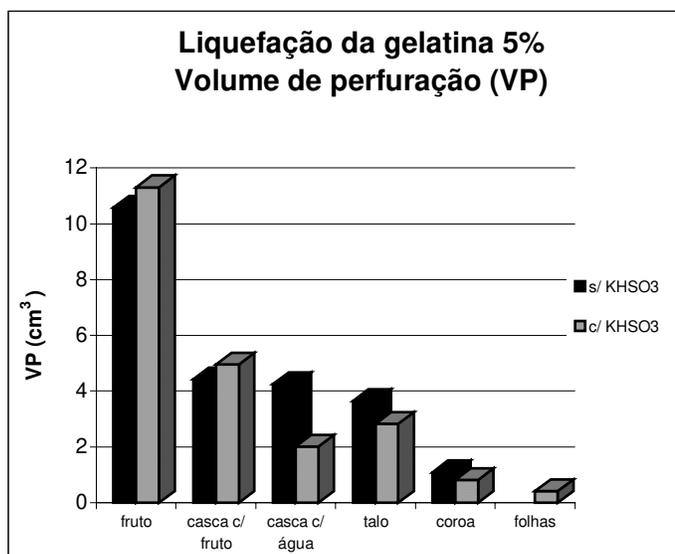


Figura 5: Resultados dos volumes de perfuração da gelatina.

Os resultados mostram que a amostra relativa ao fruto possui o maior poder de hidrólise. Esta será utilizada, portanto para os ensaios de precipitação. A casca possui 40% da capacidade hidrolítica do fruto, o que é interessante para a recuperação da enzima. Coroa e folhas não apresentam capacidade proteolítica considerável e com isso não serão considerados para estudo. Com exceção do fruto e da casca com fruto o metabissulfito de potássio não aumentou a capacidade hidrolítica da enzima e não foi usado como ativador

---

enzimático. Na observação dos testes com ninidrina, todos os testes apresentaram cores violáceas, indicando a presença de aminoácidos e peptídeos de cadeia curta devido à hidrólise da gelatina.

Realizaram-se as análises de proteína total, açúcares redutores e atividade enzimática de amostras preparadas da polpa do fruto, da casca e do talo para a caracterização do meio inicial. As concentrações e os resultados são mostrados nas tabelas 1 e 2. O fruto e o talo apresentam o mesmo teor de proteína total, porém o talo apresenta cerca de 60% menor quantidade de enzimas proteolíticas. O abacaxi utilizado para as análises foi o fruto maduro, por isso apresentou uma quantidade elevada de açúcares redutores expressos em glicose, 0,2 a 0,4 g/g de abacaxi. É importante conhecer o teor de açúcares e carboidratos na amostra, pois o etanol pode precipitar carboidratos, contaminando a enzima recuperada. De qualquer forma, o talo e a casca do abacaxi maduro tem um teor de enzima considerável para recuperação, como é mostrado na tabela 3, ainda mais tratando-se de resíduo de muitas indústrias de conservas.

Foram realizados ensaios de precipitação, em diferentes concentrações de etanol (20 a 90 %v/v) da amostra de fruto, para a obtenção da curva de solubilidade da bromelina em etanol frio.

As curvas demonstradas na Figura 6 são importantes para o conhecimento do comportamento de solubilidade da enzima em diferentes concentrações de etanol e estudar a possibilidade de uma precipitação fracionada em dois cortes, capaz de fornecer uma recuperação considerável da enzima com aumento de pureza da mesma.

As condições experimentais foram: precipitação em um único estágio, temperatura de precipitação de 5°C, pH original da amostra (o pH varia com a adição de etanol de 3,2 a 4, dependendo da quantidade de etanol adicionada), tempo de contato entre o etanol e as proteínas presentes na amostra de 15 minutos. A adição do etanol foi feita lentamente até 20 %v/v de etanol na amostra devido à evolução de calor, depois o etanol frio foi adicionado de forma “*batch*”.

Os resultados obtidos mostram que com 80% v/v precipita-se praticamente toda a bromelina presente, porém precipita-se somente cerca de 20% das proteínas iniciais, o que

leva a um aumento de pureza de até 5 vezes, o que é bastante considerável para uma técnica de baixo poder de purificação como a precipitação. Portanto, mesmo realizando uma precipitação “*batch*”, ou seja, com apenas um único estágio de adição do etanol, purifica-se consideravelmente a enzima presente no abacaxi. A recuperação de cerca de 100% da atividade é importante, pois isso significa uma economia no custo do produto final, uma vez que o controle da temperatura em 5°C é essencial. Não é possível prever se em escala piloto seriam obtidos os mesmos dados de recuperação obtidos em escala de laboratório, porém esses dados de solubilidade podem indicar tendências a serem seguidas em escalas maiores de trabalho.

Foi verificada a possibilidade de realização de uma precipitação fracionada, em dois cortes, como mostra a Figura 6 :

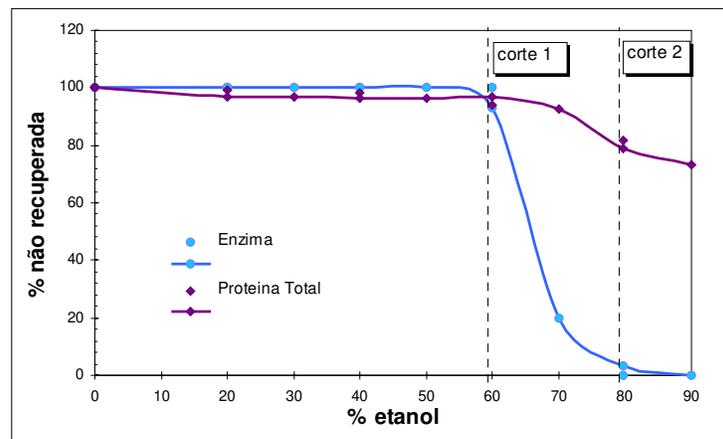


Figura 6: Curva de solubilidade em etanol da bromelina e das proteínas presentes no abacaxi.

Uma precipitação fracionada seria realizada para obter um maior grau de purificação da enzima. Trata-se de uma primeira adição de etanol em uma porcentagem volumétrica adequada para a precipitação de uma parte das proteínas presentes exceto a enzima de interesse realizando-se assim uma pré-purificação. O sobrenadante recolhido sofre então uma nova adição de etanol para aumentar a sua concentração volumétrica, afim então de precipitar a enzima de interesse em uma nova fase precipitada.

Muitos fracionamentos seguidos poderiam ser utilizados com o intuito de obter um maior grau de purificação, porém, optou-se por purificar o precipitado utilizando um método mais moderno e seletivo, que é a extração líquido-líquido em duas fases aquosas.

## 5.2. Extração em Contínuo

Para a extração em contínuo foi utilizada uma micro-coluna para extração líquido-líquido em duas fases aquosas, num sistema PEG/sal. A linha de amarração utilizada foi determinada por César (2000), utilizando caldo prensado de abacaxi. Porém, ao inserir o caldo na micro-coluna observou-se que a alta concentração de proteínas contaminantes bem como as águas deslocavam o equilíbrio do sistema tornando a extração inviável, pela não formação das fases. Partiu-se então para a utilização do processo na micro-coluna como uma etapa de purificação, utilizando para isso, precipitado obtido da extração com etanol.

### 5.2.1 Descrição do Equipamento

Um esquema da micro-coluna de campânulas pulsantes é mostrado na Figura 7. Esta micro-coluna, é constituída de um tubo de acrílico de 30 cm de altura, com diâmetro interno de 2,70 cm em parede de 0,15 cm de espessura. (BERTEVELLO, 2001)

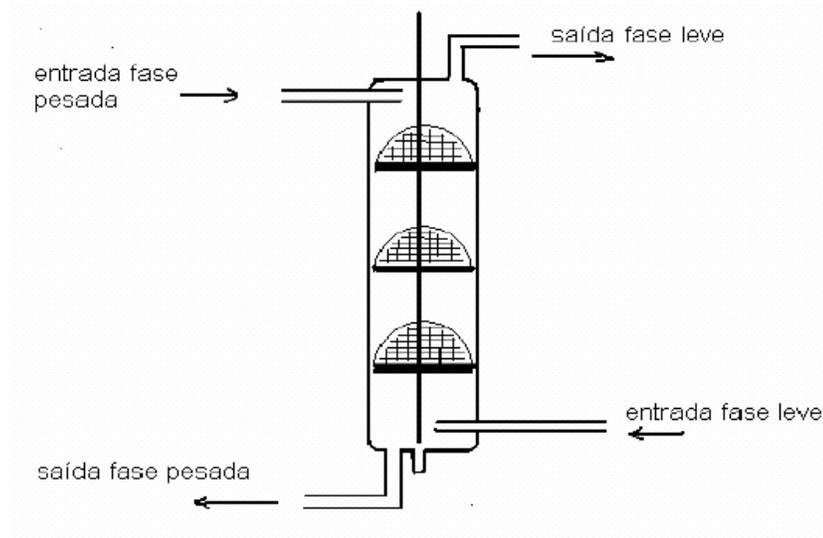


Figura 7 : Esquema da micro-coluna de campânulas pulsantes.(Bertevello, 2001)

No centro da micro-coluna, está localizada uma haste de aço inox, na qual estão coladas três campânulas que estão distanciadas 6cm uma das outras. O diâmetro da base das campânulas é de 2,68 cm. As campânulas são construídas com uma base de latão e uma peneira de aço de malha MESH 24 e, portanto, possui uma área livre para o escoamento de 38%.

---

Durante o pulso, a campânula movimenta-se num percurso de 2 cm para baixo e 2cm para cima, o que faz uma amplitude de 4 cm.

Os pulsos são fornecidos por um dispositivo, que proporciona um movimento harmônico controlado por um motor.

Os bocais de alimentação e saída são de aço inox e possuem um diâmetro interno de 2,5 mm e um diâmetro externo de 3 mm. Tanto as conexões da base, como do topo da micro-coluna são de Teflon.

A alimentação na coluna de cada fase, tanto a leve como a pesada é feita através de duas bombas peristálticas independentes, previamente calibradas.

Os tubos que conduzem as entradas e saídas das fases são de silicone, com diâmetro interno de 2 mm. Os tubos de silicone, além de serem muito flexíveis, são compatíveis com as soluções utilizadas.

Os experimentos foram realizados com temperaturas na faixa de 19 °C a 23 °C.

### **5.2.2. Procedimentos de Operação da Micro-Coluna.**

Para operação da micro-coluna, com a finalidade de obter-se dados relativos à hidrodinâmica, transferência de massa e eficiência, foi desenvolvido o seguinte procedimento :

Primeiro, enche-se a micro-coluna com a fase contínua, ou seja, a fase rica em Sal, que neste caso é a fase pesada. Em seguida, coloca-se em operação a bomba peristáltica com alimentação da fase pesada, ajustando-se a vazão de entrada e saída. Após o ajuste da vazão, aciona-se o sistema de pulsação e ajusta-se a sua frequência no valor desejado.

Posteriormente, coloca-se em operação a bomba peristáltica que alimenta a fase dispersa, que é a fase leve (fase rica em PEG), iniciando sua alimentação com a vazão desejada. O controle de vazão da saída da fase leve é feito em nível, ou seja, sua saída é feita quando esta completa o espaço na micro-coluna relativo a sua coalescência e decantação da fase pesada que possa ter sido arrastada na operação.

---

Após o início da alimentação da fase leve, anota-se o tempo até que esta comece a sair da coluna, onde tem-se então efetivamente o início de operação do equipamento. Quando do início da saída da fase leve, começa-se a contagem de tempo de operação da micro-coluna. O tempo de operação foi inicialmente de 40 minutos, quando se pode definir o tempo em que o sistema entrava em regime permanente (estado estacionário), para as condições de operação definidas neste trabalho. Posteriormente, para os ensaios de transferência de massa e eficiência este tempo foi reduzido a 30 minutos de operação efetivamente, sendo que o estado estacionário é atingido com menos de 20 minutos.

No estado estacionário, as concentrações de saída das duas fases praticamente não variam com o tempo, havendo pequenas oscilações, o que ocorre normalmente nos sistemas reais. Num sistema em regime permanente, teoricamente as concentrações não variam com o tempo, ou seja, em sistemas que trabalham muito próximos dos sistemas ideais.

Durante a operação do equipamento foram feitas coletas periódicas de amostras nas saídas das fases leve e pesada da micro-coluna, para posterior análise de proteína total e atividade enzimática. Foram realizadas também medidas de vazão, através da coleta de um volume conhecido num determinado período de tempo. Com esses dados pode-se conhecer tanto o comportamento das concentrações, como das vazões ao longo do tempo de operação.

A fase contínua (pesada) e dispersa (leve) entram em contato no interior da micro-coluna, onde ocorre a transferência de soluto entre as fases. As fases que deixam a coluna são: extrato que é constituído principalmente por solvente e o soluto extraído (neste caso, a saída da fase leve), e a fase refinado, que é rica no meio de alimentação e do soluto não extraído.

### **5.2.3. Variáveis Estudadas**

No trabalho de BERTEVELLO, 2001, foram analisadas as influências de algumas variáveis de operação sobre a transferência de massa e hidrodinâmica da micro-coluna, possibilitando a identificação das melhores condições de operação do sistema.

Na Tabela 8, são apresentadas as variáveis que são avaliadas na operação do equipamento e seus valores.

	Valor mínimo	Valor máximo
Razão entre as fases	0,8	1,1
Frequência de pulsos(pulso/min)	33	43

Tabela 8 :Variáveis estudadas na operação da Micro-coluna Fonte: BERTEVELLO, 2001

Nos experimentos em descontínuo, variou-se a composição, pH e peso molecular do sistema de duas fases aquosas a fim de se encontrar as melhores condições termodinâmicas (coeficiente de partição), de extração. Foram estudados duas linhas de amarração, dois níveis de pH e dois pesos moleculares de PEG.

Com o objetivo de estudar a influência das vazões e da frequência de pulso das campânulas na transferência de massa da coluna, trabalhou-se com um peso molecular, um pH e uma linha de amarração definida pela extração em descontínuo apresentada anteriormente por CÉSAR (2000).

### 5.3. Extração Contínua Utilizando Uma Micro-Coluna De Campânulas Pulsantes

A seleção de sistemas de extração líquido-líquido para aplicações em larga escala implica o recurso de regras convencionais bem definidas em processo de engenharia química: diferenças de densidade entre as fases superiores a 5% são desejáveis, a viscosidade de ambas as fases devem ser inferiores a 10 mPas e a tensão superficial deve situar-se entre 1 a 50 mPam. Estas condições são desejadas para a formação de uma dispersão de fases adequada (CUSACK te al., 1991). Os SBA possuem propriedades físicas que os tornam diferentes dos sistemas convencionais orgânicos-aquosos empregados em engenharia química. Nos sistemas aquosos, a fase pesada exibe valores de viscosidade superiores a 10 mPas e tensão interfacial é superior a 1 mPam. A diferença de densidade entre as fases constitui o único parâmetro que se encontra dentro dos limites referidos anteriormente.

Apesar das dificuldades, os sistemas bifásicos têm sido aplicados com sucesso a processos de extração líquido-líquido em larga escala. De modo geral, as colunas de extração, pela sua simplicidade de construção e operação, constituem uma alternativa atrativa quando se deseja misturar, equilibrar e separar duas fases líquidas imiscíveis. A

---

grande vantagem no recurso das colunas é a eliminação do emprego de dispendiosas centrífugas, uma vez que a separação de fases é promovida pela gravidade (BERTEVELLO, 2001)

Para os ensaios de extração em contínuo BERTEVELLO, 2001, utilizou o sistema PEG 1500 e fosfato de potássio em pH 7, nas concentrações globais de 17,5% peso e 17,5% peso respectivamente. O sistema foi escolhido por se tratar de um sistema que além da disponibilidade de material, suas características e propriedades já foram amplamente estudadas (RABELO, 1999).

### **5.3.1. Planejamento de Ensaios**

Para a investigação da influência dos parâmetros de operação da micro-coluna, BERTEVELLO (2001), utilizou a metodologia de planejamento fatorial, onde a definição de cada ensaio é apresentada a seguir com os efeitos e seus níveis .

Ensaio tipo E1

Relação entre as vazões das fases leve e pesada (RV): 1,1

Frequência de pulsação das campânulas perfuradas (FP): 43 pulsos/min

Ensaio tipo E2

Relação entre as vazões das fases leve e pesada: 1,1

Frequência de pulsação das campânulas perfuradas: 33 pulsos/min

Ensaio tipo E3

Relação entre as vazões das fases leve e pesada: 0,8

Frequência de pulsação das campânulas perfuradas: 33 pulsos/min

Ensaio tipo E4

Relação entre as vazões das fases leve e pesada: 0,8

Frequência de pulsação das campânulas perfuradas: 43pulsos/min

O efeito combinado das variáveis é representado pela Tabela 9

Efeito		(-)	(+)
1	Razão entre a vazão das fases	0,8	1,1
2	Frequência de pulso(Pulso/min)	33	43

Tabela 9 : Descrição dos níveis e efeitos. Fonte: BERTEVELLO, 2001

### 5.3.2 Efeito da Razão entre as vazões das fases (RV) e da Frequência da pulsação (FP) das Campânulas na Porcentagem de Recuperação de Proteína Total com Bromelina P.A.

Para uma primeira investigação das influências dos parâmetros de operação da micro-coluna, foi utilizada Bromelina P.A. solubilizada na fase salina. Este procedimento permite, num primeiro momento, localizar condições mais adequadas de operação da coluna e determinar faixas de variação das variáveis independentes avaliadas nesse processo (BERTEVELLO, 2001).

Pode se observar na Tabela 10, que o resultado mais significativo é o da interação entre os efeitos, e que se aumentando a razão entre as fases, ou aumentado-se a frequência de pulso há um aumento na porcentagem de recuperação.

Efeito	
Média	94,4
1	2,1
2	1,8
12	5,6
Erro	1,1

Tabela 10 : Efeitos calculados para porcentagem de recuperação de proteína total.

### 5.3.3. Efeito da Razão entre as vazões das fases (RV) e da Frequência da pulsação (FP) das Campânulas na Recuperação de Proteína Total.

A necessidade de desenvolver sistemas mais econômicos e aplicáveis em processos de larga escala torna também a coluna de campânulas pulsadas uma candidata com atrativos, quando se deseja estudar a sua capacidade de recuperação de proteínas a

partir de uma solução inicial. Assim fica clara a importância de um estudo da influência das variáveis independentes na recuperação da proteína total.

A Tabela 11 mostra os resultados encontrados para porcentagem de recuperação de proteína total nos ensaios realizados, sendo que o ensaio E4 é realizado em triplicata, e o valor para este ensaio corresponde a média obtida na triplicata.

Pode-se observar na Tabela 11 que os resultados encontrados para recuperação da proteína a partir da solubilização do precipitado do caldo de abacaxi, apresentam resultado satisfatório para recuperação de proteína total, 60% em média.

	RV	FP	%Rec. PT
E3	0,8	33	60,10
E4	0,8	43	55,63
E2	1,1	33	66,50
E1	1,1	43	70,00
Média			60,06

Tabela 11 - Porcentagem de recuperação de proteína total

A Tabela 12 apresenta o cálculo do efeito de cada variável e do efeito combinado de ambas na recuperação da proteína total.

Na Tabela 12 observa-se que o efeito mais significativo é a relação entre as vazões das fases leve e pesada, quanto maior esta relação, ou seja, quanto maior a vazão da fase leve, maior será a recuperação de proteína, como era esperado. Verifica-se também que a frequência de pulsação não é significativa para a faixa de trabalho e que a combinação dos efeitos não é também tão significativa

Efeito	
(1)RV	10,385
(2)FP	-0,97
12	7,97
erro	6,01

Tabela 12 - Cálculo dos efeitos para recuperação da proteína total

#### **5.3.4. Efeito da Razão entre as vazões das fases (RV) e da Frequência da pulsação (FP) das Campânulas na Recuperação da Atividade da Bromelina.**

O efeito das variáveis independentes do equipamento na recuperação da atividade enzimática foi avaliado também por BERTEVELLO, 2001 pelos ensaios propostos no planejamento experimental. Em se tratando de enzimas, a porcentagem de recuperação de atividade enzimática nos apresenta a capacidade de seletividade do sistema empregado na separação e recuperação.

A Tabela 13 mostra o resultados encontrados para porcentagem de recuperação de atividade enzimática nos ensaios realizados, sendo que o ensaio E4 é realizado em triplicata, e o valor para este ensaio corresponde à média obtida na triplicata.

Pode-se observar Tabela 13 que os resultados encontrados para recuperação da atividade a partir da solubilização do precipitado do caldo de abacaxi, apresentam excelentes resultado para recuperação de atividade enzimática, o que mostra uma grande eficiência do processo na recuperação da bromelina

	RV	FP	Atividade
E3	0,8	33	38,52
E4	0,8	43	59,72
E2	1,1	33	59,7
E1	1,1	43	74,05
Média			57,99

Tabela 13 - Porcentagem de recuperação de atividade enzimática.

A Tabela 14 apresenta o cálculo do efeito de cada variável e do efeito combinado de ambas na recuperação da atividade.

Na Tabela 14 observa-se que ambos os efeitos das variáveis independentes são significativos, e que o aumento da relação entre as vazões das fases leve e pesada, aumenta a recuperação da bromelina. Mas na frequência de pulsação das campânulas esse é efeito é praticamente o dobro. BERTEVELLO (2001), observa que o efeito combinado das variáveis não é significativo neste estudo.

Efeito	
(1)RV	17,755
(2)FP	35,55
12	-6,85
erro	9,06

Tabela 14 - Cálculo dos efeitos para recuperação de atividade enzimática.

## 5.4. Métodos Analíticos

### 5.4.1. Determinação de Proteína Total

O método de BRADFORD (1976) foi utilizado para determinar a concentração de proteínas totais presentes nas duas fases. Este método baseia-se na ligação da substância Coomassie Brilliant Blue G-250 com a proteína, formando um complexo colorido que possui máxima absorção de cor na faixa de 465 a 595 nm.

O reativo foi preparado dissolvendo-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol a 95% sob vigorosa agitação. A esta solução adicionaram-se 100 mL de ácido fosfórico a 85% e diluiu-se com água destilada até o volume final de 1 L.

Procedimento:

Em um tubo de ensaio colocam-se 100 µL da amostra e 5 mL do reativo. Agita-se o tubo em vórtice e deixa-se em repouso por 5 minutos. Em seguida, lê-se a absorbância das amostras a 595 nm. O branco foi preparado com água destilada. Para os cálculos da concentração de proteína, fez-se uma curva de calibração utilizando soluções de albumina bovina (BSA) com concentrações variando de 100 a 1000mg/L.

### 5.4.2. Determinação da Atividade Enzimática

A atividade proteolítica foi determinada pelo método descrito por MURACHI (1976) e BALDINI *et. al.* (1993) através da hidrólise enzimática da caseína a 1,2% (p/v) pH 6,0 a 35°C durante 10 minutos, seguindo-se de precipitação do substrato não hidrolisado com solução de ácido tricloroacético (TCA). No branco, a adição de solução de TCA foi

feita antes da adição da enzima. A quantidade de produtos hidrolíticos não precipitados, ou seja, de peptídeos solúveis em TCA foi determinada a 280 nm contra um branco.

Uma unidade de atividade enzimática corresponde a quantidade de enzima capaz de variar em uma unidade a leitura de absorbância a 280 nm, durante 10 min a 35°C.

A atividade específica foi expressa como unidades de enzima por mg de proteínas.

## 5.5. Metodologia de Cálculo

### 5.5.1. Coeficiente de Partição

$$K = \frac{[fasesuperior]}{[faseinferior]} \quad \text{Equação 2}$$

$$Kp = \frac{P_{topo}}{P_{fundo}} \quad \text{Equação 3}$$

Então:

$$K_a = \frac{A_{topo}}{A_{fundo}} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

$A_{topo}$  é a atividade enzimática da fase superior (U/mg de proteína)

$A_{fundo}$  é a atividade enzimática da fase inferior (U/mg de proteína)

---

$P_{\text{topo}}$  é a concentração de proteínas totais na fase superior (mg/L)

$P_{\text{fundo}}$  é a concentração de proteínas totais na fase inferior (mg/L)

### 5.5.2. Atividade Específica

A atividade específica foi calculada pela equação 5:

$$A_e = \frac{A}{P} \quad \text{Equação 5}$$

Onde: A é atividade enzimática (mg/L)

P é a concentração de proteínas totais ( mg/L)

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

O processo de extração e purificação das enzimas proteolíticas presentes no abacaxi que é proposto neste trabalho tem por objetivo demonstrar uma metodologia de apuração dos custos e viabilidade de um processo desenvolvido no âmbito da universidade, mas com grande aplicação mercadológica. Propõe-se fomentar a análise econômica dos processos científicos desenvolvidos na universidade, a fim de estimular o investimento de empresas que necessitam de inovações tecnológicas no seu processo produtivo.

Foram identificados os custos diretos de fabricação de cada uma das etapas: extração em descontínuo (precipitação) e extração em contínuo (extração líquido-líquido), levando em consideração os rendimentos obtidos em escalas laborais por CÉSAR (1999) e BERTEVELLO (2001).

Para a análise de viabilidade econômica, foi utilizado o método do *markup*, pois este, independe de um diagrama de fluxo de caixa. Os cálculos foram realizados baseados em uma escala laboral, executada por um funcionário de nível técnico, com jornada de trabalho de 40 horas semanais. Os encargos salariais foram baseados nos valores médios praticados aos empregados enquadrados no regime da CLT (confederação das leis trabalhistas).

### 6.1. Custos da Extração por Batelada

A extração por batelada é realizada adicionando-se etanol no caldo prensado de abacaxi. Para tanto são necessários os equipamentos e seus valores listados na Tabela 15:

Equipamento	Preço Médio em R\$	Fornecedor
Centrífuga	1650,00	Quimis Aparelhos Científicos LTDA
Triturador	780,00	Quimis Aparelhos Científicos LTDA
Agitador	350,00	Quimis Aparelhos Científicos LTDA
Vidraria	1000,00	Quimis Aparelhos Científicos LTDA
Espectrofotômetro	10.000,00	Quimis Aparelhos Científicos LTDA
<i>TOTAL</i>	<i>13780,00</i>	

Tabela 15 : Descrição dos valores de investimento em equipamentos para extração por batelada. Cotação realizada em julho/2005.

A matéria-prima básica para realizar a extração são etanol e abacaxi, que tiveram, seus preços médios cotado em R\$5,20/L e R\$1,10/ kg (Casa Americana e CEASA/SP, julho, 2005).

As amostras foram preparadas com abacaxi de diversos tipos, encontrados em mercados e, exceto a coroa, foram triturados e filtrados eliminando as fibras. Os resultados obtidos mostram que com 80% v/v precipita-se praticamente toda a bromelina presente, porém precipita-se somente cerca de 20% das proteínas iniciais, fato que permite concluir que da massa inicial de abacaxi, somente 20% correspondem ao material de interesse.

Pode-se estimar que mensalmente seriam obtidos 8 kg de precipitado. O custo para este montante poderia então ser calculado, como sendo a somatória da quantidade necessária de abacaxi e etanol.

Se somente 20% da amostra será purificada, seriam então necessárias 46 kg de amostra e conseqüentemente, 1001 litros de etanol. Na Tabela 16 estão listados os custos com a matéria - prima para uma produção mensal de 8 kg de precipitado.

Matéria - Prima	Custo R\$
Abacaxi – 46 kg	50,60
Etanol – 1001 L	5255,80
TOTAL	5306,40

Tabela 16: Custos de matéria-prima para produção de 8 kg de precipitado.

A mão de obra a ser considerada configura-se no salário mensal médio de um técnico, que estimada em R\$ 500,00 por mês com jornada de 40 horas semanais. Os encargos trabalhistas somam algo em torno de 133% do salário base, portanto teríamos:

$R\$ 500,00 + R\$ 665,00 = R\$ 1165,00$  de mão de obra direta por 40 horas semanais.

Se a produção de 8 kg de bromelina é estimada para um mês de trabalho:

Custo total de Mão de Obra: R\$ 1165,00

O custo total do produto seria:

CT= Custo da Matéria - Prima + Custo da Mão de Obra

$CT = 5306,40 + 1165,00 = 6471,40$ , que corresponde a produção de 8 kg de precipitado. O custo por kg , seria então de R\$ 808,90.

Para calcular o preço de venda é necessário considerar algumas despesas, além da carga tributária, que estão descritas na Tabela 17.

Despesas	Porcentagem
ICMS	18%
PIS/COFINS	9,25%
Despesas de Venda	4%
Despesas Administrativas	6%
Total	37,25 %

Tabela 17: Descrição de despesas e tributos

O preço de venda (PV) é definido pela equação:

$$PV = \frac{CT}{1 - \sum \text{Despesas} + \text{Im postos} + M \text{ arg em}} \quad \text{Equação 7}$$

Portanto tem-se o preço de venda em R\$ 1289,00/kg sem acrescentar qualquer margem de lucro.

A Tabela 18 demonstra a variação do preço de venda por kg de precipitado, com a margem de lucro.

Margem de Lucro (%)	Preço de Venda (R\$/kg)
10	1533,5
20	1892,2
30	2470,0
40	3555,6
50	6344,0
60	29414,0

Tabela 18 : Variação do Preço de venda em Função da Margem de Lucro.

Pode-se encontrar no mercado um fitomedicamento com uma quantidade (AnexoA) equivalente de  $4,4 \times 10^{-3}$  mg de Bromelina por mL e sendo o mesmo vendido por R\$ 19,46 o frasco com 100 mL pode-se estimar que este laboratório teria um custo de R\$0,0528 com a bromelina, se o processo de precipitação por etanol pudesse ser utilizado.

Na Figura 8 são apresentados os resultados da evolução do preço de venda com a margem de lucro:

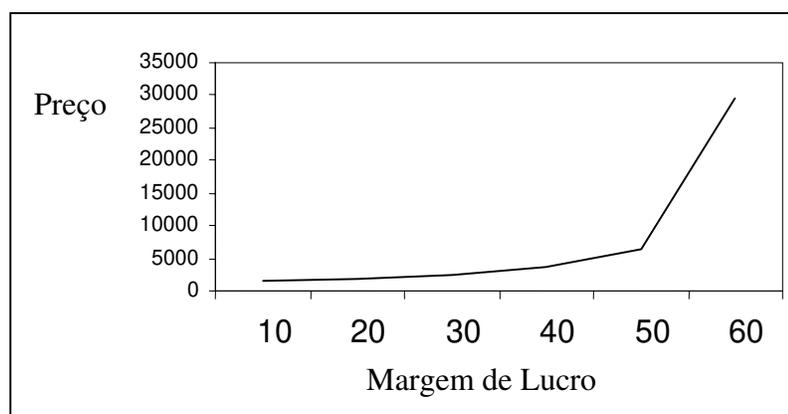


Figura 8: Variação do preço de venda em relação à margem de lucro.

A facilidade de comercialização do produto seria maior se fosse possível definir o índice de purificação desejado para a bromelina, para cada um dos usos a que ela está indicada. Além do fato de que os medicamentos precisam, necessariamente, seguir uma série de protocolos para obter o registro no Ministério da Saúde e a autorização de comercialização.

O retorno sobre o investimento pode ser obtido através da equação 8:

$$R = \frac{\text{Investimento}}{\text{Lucro líquido}} \quad \text{Equação 8}$$

As quantidades de precipitado necessárias para obter o retorno sobre o investimento são função da margem de lucro, conforme mostra a Tabela 19.

Margem de Lucro (%)	Massa de precipitado (kg)
10	19
20	13
30	8
40	5
50	2,5
60	0,5

Tabela 19: Quantidade de precipitado necessária para o retorno sobre o investimento em função da margem de lucro.

Sabe-se que em um mês a produção pode chegar até 8 kg de precipitado, nas condições descritas. Analisando os dados observa-se que o maior prazo de retorno sobre o investimento ocorreria para uma margem de lucro de 10% que apresenta um tempo médio

inferior ao desejável para que um investimento retorno seja considerado viável que é estimado em vinte e quatro meses.

Adota-se então a hipótese de que o índice de purificação obtido na precipitação não é aceitável para o mercado em que se pretende a comercialização. Surge, portanto a necessidade de aumentar seu teor de purificação e para isso utilizar-se-á a extração líquido-líquido em duas fases aquosas.

## 6. 2. Custos de Purificação

Nos experimentos realizados por BERTEVELLO (2001) foi utilizada uma micro-coluna com um sistema de agitação, e 4 bombas peristálticas.

Equipamento	Valor em R\$
Microcoluna	1000,00
Bombas (4)	7200,00
Sistema de Agitação	1800,00
TOTAL	10.000,00

Tabela 20: Custos de equipamentos para purificação em contínuo.

A Tabela 21 mostra a cotação da matéria-prima a ser utilizada na purificação.

Material	Valor em R\$	Fornecedor
Fosfato de Potássio Monobásico	23,60/kg	<i>Casa Americana</i>
Fosfato de Potássio Dibásico	28,60/kg	<i>Casa Americana</i>
Polietileno Glicol	58,40/kg	<i>Casa Americana</i>
Precipitado	1289,00/kg	

Tabela 21: Custos com matéria - prima para purificação em contínuo. Cotação realizada em julho 2005.

Como o sistema de extração líquido-líquido é utilizado para a purificação da bromelina obtida no processo de precipitação, torna-se possível utilizar a mesma mão de obra, visto que os processos necessitam de preparação e controles, mas podem ser realizados concomitantemente, ou de forma seqüenciada.

Para a extração na coluna são utilizados: solução de fosfato de potássio pH 7 e solução de PEG 1500, os custos estão estimados para 300 mL de cada uma das soluções obedecendo a concentração global utilizada por BERTEVELLO (2001). Como a eficiência do sistema está atrelada à recuperação da proteína em atividade enzimática e o valor médio

obtido é de 57,99% da massa de precipitado inserida na coluna, utiliza-se 1,73 g de precipitado na coluna a fim de obter o custo por grama de extrato purificado produzido na coluna de extração.

	Massa em g	R\$
Fosfato de potássio Monobásico	18,38 g	0,44
Fosfato de Potássio Dibásico	34,11g	0,98
Polietileno Glicol	52,5 g	3,00
Precipitado	1,73 g	2,20
<b>TOTAL DE MATÉRIA-PRIMA</b>		<b>6,68</b>

Tabela 22: Custos com matéria -prima para purificação na obtenção de 1 grama.

Como o tempo necessário para a coluna entrar em regime permanente gira em torno de 40 minutos, e foi proposta a utilização da mesma mão de obra, pode-se concluir que o custo total será obtido somente através da matéria-prima.

Percebe-se que o custo operacional do processo de purificação é menor que o custo operacional do processo de extração, porque é utilizada a extração líquido-líquido em duas fases aquosas, formada essencialmente de água, com um consumo reduzido de reagentes.

Para o cálculo do preço de venda as despesas adicionais e tributárias serão as mesmas utilizadas anteriormente, com a equação 7, então teremos:

$$PV = \frac{CT}{1 - \sum \text{Despesas} + \text{Im postos} + M \text{ arg em}}$$

PV = 10,65/g sem margem de contribuição.

A Tabela 23 apresenta um estudo da evolução de preço de venda do extrato purificado em função da margem de lucro.

Margem de Lucro(%)	Preço de Venda (R\$)
10	12,66
20	15,62
30	20,40
40	29,36
50	52,40
60	242,90

Tabela 23: Evolução de preço de venda do extrato purificado em função da margem de lucro.

A Figura 9 demonstra a evolução do preço de vendas em função da margem de lucro:

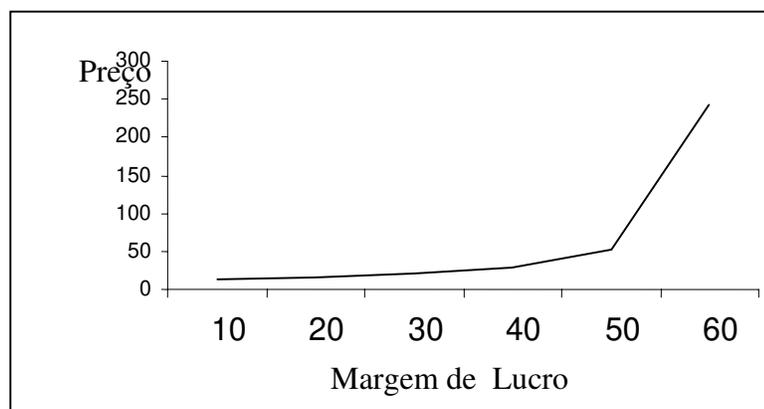


Figura 9: Evolução do preço de vendas em função da margem de lucro.

O retorno sobre o investimento deve ser calculado, da mesma maneira, utilizando a Equação 8 e portanto teríamos:

$$R = \frac{\text{Investimento}}{\text{Lucro líquido}}$$

A Tabela 24 apresenta a mínima quantidade em gramas de extrato purificado a ser vendida em função da margem de lucro, que justifica o investimento.

Margem de Lucro (%)	Quantidade em g
10	4975
20	2012
30	1025
40	535
50	240
60	43

Tabela 24: Quantidade em gramas de extrato purificado a ser vendida em função da margem de lucro para retorno sobre o investimento.

No caso de ter-se mercado consumidor para a quantidade mínima a ser vendida para justificar o investimento num prazo inferior a dois anos, pode-se considerar o processo de purificação com a micro-coluna.

Considerando uma produção de 200 g por mês, o prazo de retorno do investimento (*pay back*), em meses, poderia ser apresentado em função da margem de lucro como mostra a Figura 10.

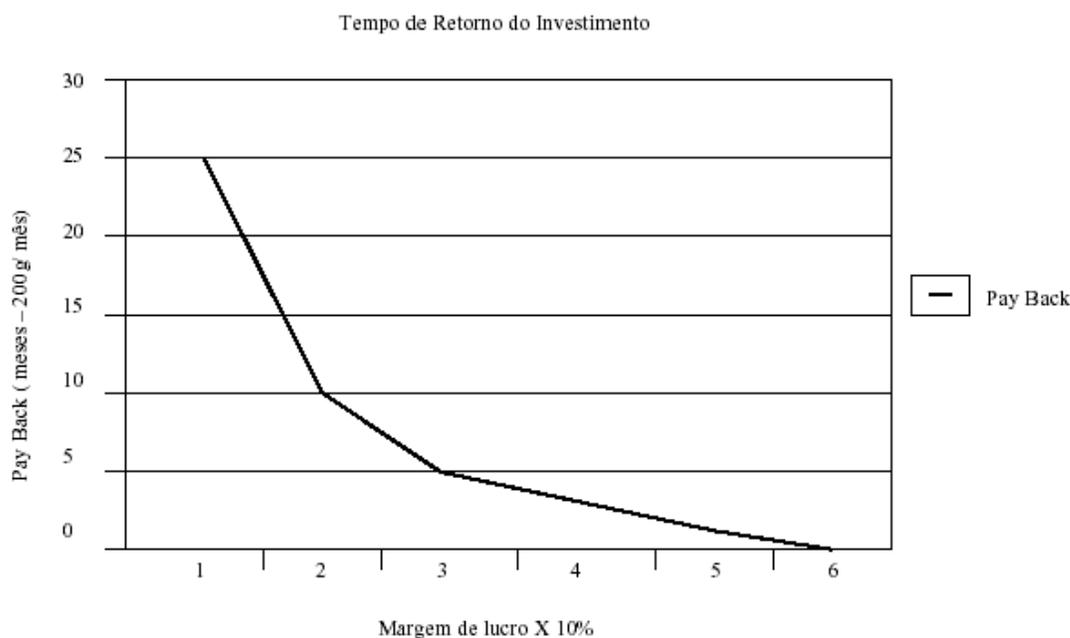


Figura 10: Prazo de retorno sobre o investimento (*pay back*) em função da margem de lucro

A grande questão ao iniciar um processo de purificação é o grau de pureza exigido para a proteína. Proteínas para fins terapêuticos ou de uso direto em humanos necessitam de um alto grau de pureza, o que não é necessário para as enzimas que serão aplicadas em processos industriais. Em uma purificação em larga escala, o processo normalmente consiste de 4 a 6 etapas que podem ser divididas em dois grupos. O primeiro é formado pelos processos de recuperação da proteína: separação e ruptura de células, separação dos fragmentos e concentração da proteína. No segundo grupo o objetivo é purificar a proteína, utilizando-se das etapas de pré-tratamento ou isolamento primário, purificação de alta resolução e refinamento final.

No caso do processo proposto neste trabalho podemos verificar que o custo das primeiras etapas pode ser sensivelmente reduzido com alternativas simples, podendo ser posteriormente utilizada a purificação de alta resolução e refinamento final.

---

Como é um processo de baixo investimento, poderia ter seus custos ainda mais reduzidos se instalado diretamente no agronegócio, onde poderiam ser utilizados no processo proposto os resíduos agrícolas, ao invés do fruto propriamente dito e o agricultor teria mais um produto a oferecer, diversificando seus ganhos.

Há ainda a ociosidade que vem sendo observada na indústria farmacêutica onde os investimentos em equipamentos seriam muito reduzidos e a proposta de inserção de um novo produto com baixos custos produtivos poderia alavancar novos negócios no setor.

O desenvolvimento de um novo processo, e a devida apuração de seus custos e prazos de retorno tornam a ciência desenvolvida em tecnologia.

Em média, os empresários que trabalham com pesquisa e desenvolvimento não aplicam mais que 0,64% de seu faturamento em inovação, seja na melhoria de seus produtos ou na compra de equipamentos.

A Lei de Inovação representa um grande avanço no setor, pois permite às empresas inovadoras abaterem no Imposto de Renda, por exemplo, 160% do total investido em pesquisa e desenvolvimento (P&D), podendo chegar a 200% caso apresentem, em seus quadros, mestres e doutores, além de produtos patenteados.

O custo de desenvolvimento interno de um produto novo pode alcançar valores muito elevados (KOTLER, 1998), então uma alternativa viável é incentivar o desenvolvimento de tecnologias nos centros de excelência em pesquisa, normalmente concentrados nas universidades, reduzindo os custos de desenvolvimento e aplicando a ciência desenvolvida no próprio país.

---

## 7. COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES

- A bromelina é uma enzima proteolítica promissora e a investigação de um método menos oneroso para sua obtenção é uma vantagem competitiva.
- Assim como o mercado de fitoterápicos, a utilização da bromelina em medicamentos ainda é pequena, mas apresenta grandes possibilidades de expansão.
- O processo desenvolvido pode ser utilizado mundialmente, pois utiliza materiais simples e reagentes analíticos disponíveis, de fácil obtenção e baixa toxicidade.
- O estímulo ao investimento em novas tecnologias é crescente no Brasil que é deficiente no desenvolvimento de inovações.
- O método utilizado para apurar os custos de fabricação é simples e pode ser aplicado em outros processos em desenvolvimento, facilitando assim a busca de fomento de investidores do setor privado.
- O processo pode ser utilizado para a redução de várias etapas de recuperação e purificação de proteínas de forma mais econômica que os métodos cromatográficos tradicionalmente utilizados.
- Tendo o clima favorável e sendo o Brasil o segundo maior produtor de abacaxi, utilizando-se das novas tecnologias desenvolvidas, o agricultor poderá diversificar sua oferta de produtos, utilizando resíduos agrícolas.
- A solução para a redução da importação é o desenvolvimento interno de produtos e processos, utilizando mão de obra e matéria - prima nacional.
- Os custos apurados, nas condições propostas são de R\$ 808,90/kg de precipitado e R\$ 10,65/g de extrato purificado.
- A análise econômica revelou a possibilidade concreta de aplicação comercial do método proposto.

## 8. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Uma vez que não é possível a obtenção de um trabalho totalmente completo e abrangente, porque a ciência é um organismo vivo e em pleno desenvolvimento torna-se importante a apresentação de algumas sugestões que possam contribuir para aprofundar os conhecimentos no processo de extração e recuperação proposto. Assim, como continuação do trabalho efetuado, propõe-se:

- Realizar o biomonitoramento do processo, com o objetivo de identificar precisamente o tipo e grau de purificação da bromelina obtida em cada etapa do processo e suas aplicações terapêuticas.
- Realização de uma pesquisa de mercado para a bromelina
- Utilização de outros processos de purificação como a diálise ou a ultrafiltração.
- Realização dos ensaios utilizando como matéria prima o resíduo agrícola, tais como a haste (*steam*) do abacaxi.

---

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES-BARROS, MR., Extração líquido-líquido de produtos biológicos: recuperação de produtos de fermentação(ácidos carboxílicos) e proteínas. Lisboa, 1990.184 p. Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior Técnico
- ALBERTSSON, P.A., Partition of Cell Particles and Macromolecules, John Wiley, 2<sup>rd</sup>., 1971.
- ALBERTSSON, P.A., Partition of Cell Particles and Macromolecules, John Wiley, 3<sup>rd</sup>., 1986.
- ALBERTSSON, P.A.; TJERNELD, F., *Phase Diagrams. Methods in Enzymology*, v.228, p.3-13, 1994
- ALLINGER, KN.L.; CAVA, M.P.; DE JONGH, D.C.; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N.<sup>a</sup>; STEVENS, C.L.Química Orgânica, 2 ed. Rio de Janeiro, ed Guanabara Koogan, 1978
- ASENJO, J.A., Aqueous two-phase for: I. Systems, principles and manipulation of selectivity.II.Processes and models. São Paulo, 1994. Apostila Instituto de Pesquisas Tecnológicas.
- ASENJO, J.A., Industrial prospects of aqueous two-phase processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, V. 59, P.109, 1994
- ASENJO, J.A., Separation processes in biotechnology. New York, Marcel, Dekker, 1990
- BALDINI, V.L.S.; IADEROZA, M.; FERREIRA, E.A.H.; SALES, A.M.; DRAETTA, I.S. e GIACOMELLI, E.J. Ocorrência da Bromelina e cultivares de abacaxizeiro. **Colet. ITAL**, v.23, n.1, p.44-55, Campinas, 1993.
- BAMBERGER, S.; SEAMAN, G.V., BROWN, J.A., BROOKS, D.E., *The partition of sodium phosphate and sodium chloride in aqueous dextran-polyethyleneglycol two phase systems*, *J. Coll. And Interf. Sci.*, v.99, n.1, p. 187-193, 1984.
- BAMBERGER, S.; BROOKS, D.E.; SHARP, K.A.; VAN ALSTINE, J.M.; WEBWE, T.J., Preparation of phase system and measurement of their

- 
- physicochemical properties*.IN: BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D. Partitionning in aqueous two phase systems. Orlando, Academic Press, 1985.
- BATEMAN, T.S.; SNELL, S.A. Administração: construindo vanatgem competitive. São Paulo, Atlas, 1998.
- BELTER P.A., CUSSLER, E.L.; HU, W.S.Bioseparotions: downstream processing for biotechnology. Minneapolis, Jhn Wiley & Sons, 1988.
- BERNARDI, L.A., Política de Formação de Preços: Uma Abordagem Competitiva, Sistêmica e Integrada, São Paulo, \_Atlas, 1998.
- BERVEVELLO, L.C.,Estudo do processo de recuperação e separação da bromelina utilizando sistema de duas fases aquosas em micro-coluna de extração.Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, 2001.
- BRADFORD, M. M., *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, v. 72, 1976.
- BASKIR, J.N., HATTON,T.A., SUTTER, U.W.*Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems*, Biotechnology Bioeng., v.34, p.541-558, 1989.
- BROOKS, D.SHARP, K. FISHER, D. *Theorical Aspects of partitioning*.IN: Partitioning in aqueous two-phase systems, H. Walter, D.E. BROOKS, D.FISHER, academic Press, Orlando, 1985.
- BRUNS, R.E.; SCARMÍNIO, I.S.; BARROS NETO, B., Planejamento e Otimização de Experimentos, 2ª edição, Editora UNICAMP, São Paulo, 1996. 299p
- BROOKS, D.E.; NORRIS-JONES, R., *Preparation and analysis fo two-fases systems*. Methods in Enzymology, v. 228, p. 14-27, 1994.
- BULGERMAN, R.A.; MAIDIQUE, M.A., Strategic management of technology and innovation. Illinois, Irwin, 1988.
- BUZZEL, R.D., WISERMA, F.D., Succesful share:building strategies. Havard Business Review, jan-fev., 1981.
- CABEZAS Jr, H. *Theory of phase formation in aqueous two-phase systems* Journal of Chromatography B, V. 680, p. 3-30, 1996.

- 
- CASCONE, O; ANDREWS, B.A.; ANSEJA, J.A., *Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems*. Enzyme Microbiology and Tecnology, v.13, p. 629-635, 1991.
- CAVALCANTE, P.B.; *Frutas comestíveis da Amazônia* ; Publicações avulsa s17, 1972
- CESAR, A.C.W., SILVA, R. e LUCARINI, A.C., *Recuperação das Enzimas Proteolíticas Presentes na Casca e Talo do Abacaxi*, R I C, 01, 47-54 , São Carlos, 1999.
- CESAR, A.C.W., *Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi*, Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2000.
- CLEMEN, R.T., *Making hard decision:an introduction to decision analyses*, Belmont: Duxbury, 1996.
- CHALOS, P. , *Managing costs in todays manufacturing environment*, New Jersey, Prentice Hall, 1992.
- COHAN, P.S., *Liderança Tecnológica: como as empresas de alta tecnologia inovam para obter sucesso*, São Paulo, Futura, 1998.
- COIMBRA, J.S.R., *Desempenho de um extrator tipo Grassier na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos*. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995.
- DACORSO, A.L., YU, A.S.O.A *inovação e risco na pequena empresa*. In: XXI Simpósio de Gestão da Inovação Tecnológica. São Paulo, 2000.
- DAUSCHA, R.M., *Investimentos Escassos*, Boletim Agência Fapesp, 25 jul 2005.
- DIAMOND, A.D., HSU, J.T., *Aqueous Two-phase Systems for Biomolecule Separation*, IN: *Advances in Biochemical Enginnering Biotechnonology*, Managing (ed), Springer- Verlag Berling Heidelberg, v.47, p. 90-134, 1992
- DRUCKER, P.F., *Japan: new strategies for a new reality*. *Wall Street Journal*, 2 oct, 1991.

- 
- EITEMAN, M.A., *Temperature-dependent phase inversion and its effect on partitioning in the poly(ethylene glycol) ammonium sulphate aqueous two-phase system*, Journal of Chromatography A, v. 668, p. 13-19, 1994
- EITEMAN, M.A.; GAINER, J., *Predicting partition coefficients in polyethylene glycol-potassium phosphate aqueous two-phase system*. Journal Of Chromatography A, v. 586, p. 341-346, 1991.
- FRANCO, T.T. *Use of modified proteins in aqueous two-phase systems. Effect of surface hydrophobicity and charge*. Tese de doutorado. Faculty of Agriculture and Food, University of Reading, 1992
- FREITAS, J.B. *A dimensão técnico-científica da inovação*. Brasília: revista SEBRAE. 1996.
- FORCINITI, D.; HALL, C.K.; KULA, M.R. *Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in ATPS*. Fluid Phase Equilibria, v. 61, p. 243-262, 1991.
- FORCINITI, D.; HALL, C.K.; KULA, M.R. *Protein partition at the isoelectric point: influence of polymer molecular weight and concentration and protein size*. Biotechnology and Bioengineering, v. 38, p. 986-994, 1991.
- GREVE, A.; KULA, M.R., *Recycling of salts in partition protein extraction processes*. Journal fo Chemical Tecnology and Biotechnology, v. 50, p. 27-42, 1991.
- GUAN, Y. e KULA, M-R, *Recycling of Salt from the Primary Bottom Phase of a Protein Extration Process*. J.Chem.Tech. Biotechnol. , 50 (1991), 27-42
- GUAN, Y. LILLEY, T. e TREFFRY, T. , *A New Excluded Volume Theory and Its Application to the Coexistence Curves of Aqueous Two-Phase Systems*, Macromolecules, 26 ( 1993), 3971-3979
- GUAN, Y.; TREFRY, T.E., LILLEY, T.H. *Application of a statistical geometrical theory to aqueous two-phase systems*. Journal of Chromatography A, 668, p-31-45, 1994.

- 
- HABER, J., *Uma contribuição para a análise da viabilidade econômica de projetos envolvendo inovação tecnológica*, Tese de Doutorado, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- HARRIS, J.M. *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications*, Ed Plenum, NY, 1992
- HIRSCHFELD, H. *Engenharia Econômica e Análise de Custos*, São Paulo, Atlas, 2000.
- HORNGREN, C.T., DATAR, S.M., FOSTER, G., *Contabilidade de Custos- Uma abordagem Gerencial*, São Paulo, Prentice Hall, 2004.
- HUDDLESTON, J.G., OTTOMAR, K.W., NGONYANI, D.M., LYDDIATT, A., *Influence of system and molecular parameters upon fractionation of intracellular proteins from Saccharomyces by aqueous two-phase partition*. Enzyme Microb. Technol., v.13, p.24-32, 1991.
- HUDDLESTON, J.G.; WANG, R.; FLANAGAN, J.A., O' BRIEN, S; LYDDIATT, A., *Variation of protein partition coefficients with volume ratio in poly(ethylene glycol) salt aqueous systems*. Journal of Chromatography A, v.668, p.3-11, 1994.
- HUSTEDT, H. KRONER, K.H. e PAPAMICHAEL, N. , *Continuous CrossCurrent aqueous TWO Phase Extration from Biomass-Automated Recovery in Production Scale*, Process Biochemistry, 23 ( 1988), 129-137
- HUSTEDT, H; KRONER, K.H.; KULA, M.R. *Applications of phase partitioning in the biotechnology*. In: BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D. *Partitioning in aqueous two-phase systems*. Orlando, Academic Press, 1985.
- JOHANSSON, G. Partitioning of proteins. In: BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISHER, D. *Partitioning in aqueous two phase systems*. Orlando, Academic Press, 1985.
- JOHANSSON, G. *Partitioning procedures and techniques: cells, organelles and membranes*. Methods in Enzymology, v.228, p. 42-63, 1994.
- KOTLER, P., *Administração de Marketing: análise, planejamento, implementação e controle*, São Paulo, 1998.

- KRONER, K.H., HUSTEDT, H. e KULA, M-R, Extractive Enzyme Recovery: Economic Considerations, Proc. Biochem. Eng. , Fiechter A., Berlin, vol 24. (1982), 73-118
- KULA, M.R., Purification of enzymes by liquid-liquid extration, IN: Advances in Biochemical Bioengineering, A.Fiechter (ed), Springer-Verlag, 1982.
- KULA, M-R, Trends and Future Prospects of Aqueous Two-Phase Extration, Biosep., 1 ( 1990 )
- LAHORE, H.M.F., MIRANDA, M.V., FRAILE, E.R., BONINO, M.J.B.J.; CASCONI, O.,Partition behaviour and purification of a *Mucor bacilliformis* acid proteases in aqueous two-phase systems. Process Biochemistry, v.30, p. 615-621, 1995
- LEHNINGER, A.L., Princípios de Bioquímica, Savier, 1995.
- MARTINS, E., Contabilidade de Custos, São Paulo, Atlas, 2003.
- MARTINS, P., LAUGENI, F.P., Administração da Produção, São Paulo, Saraiva, 2003.
- MATTOS, P.E.O, Validação Clínica da Suplementação de Bromelaína para Atletas, Projeto de Pesquisa, Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular, UNIFESP, São Paulo, 2005.
- MATIASSON, B.LING, T.G.I., Extraction in aqueous systems for biotechnology. IN: VENAL, N.S., HUDSON, M.J.,Biochemistry and Biotechnology, p. 270-292, 1987.
- MATHESON, J.D.; MATHESON,J.The smart organization:creating value through strategic, Boston, R&D HBS, 1998.
- MEDINA, J.C., BLEINTROTH, W.E., HASHIZUME, T.; ABACAXI - da cultura ao processamento e comercialização ITAL, 1978
- MINAMI, N.M., Extração Líquido-Líquido aplicada à separação e purificação da amiloglicosidase, São Paulo, 1997, 190p., Universidade de São Paulo, Dissertação de Mestrado.

- MYNOTT, T.L., LADHAM, S.A., SCARMATO, P., *Bromelain, from pineapple steams, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase – 2 in T cells*, The Journal of Immunology, p.2568 a 2575. 1999.
- MOLYNEAUX, P. Water Soluble Synthetic Polymers: Properties and Behavior, CRC, Boca Raton, voll, 1984.
- MURACHI, T. Bromelain enzymes. In: LORAND, L. Methods in Enzymology, v.XLV, p.475-85, New York, Academic Press, 1976.
- NUCCI, C, STEIW, L, BEGUOCI, L, MOURA, B, *Os eleitos da Inovação*, Revista Veja, 1912, São Paulo, Abril, 2005, 91-95.
- OLAVE, M.E.L., AMATO NETO, J.*Inovação Tecnológica em PMEs no setor das telecomunicações:principais obstáculos*. In: AMATO NETO, J.Manufatura Classe Mundial: conceitos, estratégias e aplicações. São Paulo, Atlas, 2001.
- PAPAMICHAEL, N. BOERNER, B. e HUSTED, H. Continuos Aqueous Phase Extration of Proteins: Automated and Recycling of Process Chemicals, J. Chem. Tech. Biotechnol., 54 (1992)
- PATHAK, S.P.; SUDSHA.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B.New salt polyethylene glycol systems for two phase aqueous extration. The Chemical Engineerring Journal, v. 46, p. B31-B34, 1991
- POLSON, A., POTGIETE, G.M., LARGIER, J.F., MEARS, G.E.F., JOUBERT, F.J., *Biochemical and Biophysical Acta*, v. 82, p.463, 1964.
- PORTO, A.L.F., Extração líquido-líquido de proteínas utilizando sistemas de duas fases aquosas em coluna de discos perfurados rotativos.Campinas, 1998, 98 p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 1998.
- PRADO, I. N., LALLO, F. H., ZEOULA, L. M. et al. *Níveis de substituição da silagem de milho pela silagem de resíduo industrial de abacaxi sobre o desempenho de bovinos confinados*. R. Bras. Zootec., Jun 2003, vol.32, no.3, p.737-744.
- RABELO, A.P.B., Estudo e Desenvolvimento de uma Micro-Coluna de Câmpanulas Pulsantes para Purificação de Proteínas, Campinas, 1999, 188p., Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas.

- RABELO, A.P.B, TAMBOURGI, E.B., PESSOA JR, A., *Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers*, Journal of Chromatography B, 807, 61-68, 2004.
- RACINE, L.M., *Enzimas em formulações tópicas: bromelina e papaína*, 04/2004.
- ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J. and BARRETT, A.J. *The cysteine proteinases of the pineapple plant*. Biochemical Journal, v.266, n.3, p.869-75, 1990.
- TIDD, J; BESSANT, J.PAVITT, K. *Managing innovation: integrating technological, market and organizational change*, Chichester, 1997.
- SANTOS, S.A. *Efeito do tempo na composição físico-química, química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro Ananas comosus (L.) Merr. CV. Pérola armazenado em condições com e sem refrigeração*. Lavras: ESAL, 1995. 47 p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- SARUBBO, L.A., *Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos*, Campinas, 2000. Tese de Doutorado, 174p. Universidade Estadual de Campinas, SP, 2000.
- SARMENTO, M.J., PIRES, M.J., CABRAL, J.M.S., *Liquid-liquid extration of a recombinant protein, cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts*. Journal of Chromatography A, v.668, p. 117-120, 1994.
- SCHMIDT, A.S.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A., *Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of overall protein concentration*. Biotechnology and Bioengineering, v. 50, p. 617-626, 1996.
- SCOPES, R.K. *Protein Purification: principles and practice*. 2. ed. New York, Springer Verlag, 1994, 329 p.
- SCHLUCK, A., MAURER, G., KULA, M.R., *Influence of eletrostatic interactions on partitioning in aqueous polyethylene glycol/dextran biphasic systems*. Biotechnology and Bioengineering, v.46, p.443-451, 1995.
- SEBASTIÃO, M. J. , CABRAL, M.S., AIRES-BARROS, R., *Patitionning of recombinant FUSARIUM SOLANI PISI cutinase in polyethylene glycol-aqueous*

- 
- salt solution two-phase systems*. Journal of Chromatography A, v. 668, p. 139-144, 1994.
- SUH, H.J.; LEE, H.; CHO, H.Y. and YANG, H.C. *Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple*. Journal of the Korean Agricultural Chemical Society, v.35, n.4, p.300-7, 1992
- VICO MAÑAS, A, *Gestão de tecnologia e Inovação*, São Paulo, Erica, 2001.
- VIDEIRA, M. ; AIRES-BARROS, M.R. *Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using na aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassim phosphate*. Journal of Chromatography A, v.668, p.237-240, 1994.
- WALTER, H., JOHANSSON, G., BROOKS, D.E., *Partitioning in aqueous two-phase systems: recent results*. Analytical Biochemistry, v.197, p.1-18, 1991.
- WRIGHT, P.KROLL, M.J., PARNELL, J. *Administração Estratégica*, São Paulo, Atlas, 2000.
- WU, Y.T., LIN, D.Q., ZHU, Z.Q., MEI, L.H. , *Prediction of liquid-liquid equilibria of polymer-salt aqueous two-phase systems by a modified Pitzer's virial equation*. Fluid Phase Equilibria, v. 124, p.67-79, 1996
- YANG, W.Y., LIN; C.D., CHU,I. LEE, C.J., *Extration of cephalosporin C from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin C by aqueous two-phase partition*. Biotechnology nd Bioengineering, v. 43, p. 439-445, 1994.

## ANEXO

**Bromelin** R\$ 19,46  
*Ananas comosus* L.  
 (suspensão oral)  
 MS: 1.1557.0053.001-1 (fr c/ 100ml)

**BROMELIN®**  
***Ananas comosus* L.**

### MEDICAMENTO FITOTERÁPICO TRADICIONAL

#### FORMA FARMACÊUTICA E APRESENTAÇÃO

Suspensão oral: embalagem com frasco pet contendo 100mL, acompanhado de copo-medida.

#### USO PEDIÁTRICO OU ADULTO

#### NOMENCLATURA BOTÂNICA OFICIAL (gênero, espécie, variedade, autor do binômio e família)

*Ananas comosus* L. (Bromeliaceae)

#### PARTE UTILIZADA DA PLANTA

Polpa da fruta.

#### COMPOSIÇÃO DO MEDICAMENTO, INDICANDO A RELAÇÃO REAL, EM PESO OU VOLUME DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL USADA E A CORRESPONDÊNCIA EM MARCADORES E/OU PRINCÍPIOS ATIVOS, QUANDO CONHECIDOS.

Concentrado de enzimas naturais.

Cada 1mL contém:

Extrato de *Ananas comosus*\* ..... 0,66g

Veículo q.s.p. .... 1mL

(Nipagin, Nipazol, Mel de abelhas, Benzoato de sódio, Álcool etílico, Água purificada)

\* Equivalente a 4,4 x 10<sup>-6</sup>g de Bromelina.

#### INFORMAÇÃO AO PACIENTE

O *Ananas comosus* é um produto fitoterápico com ação mucolítica e fluidificante das secreções brônquicas e das vias aéreas superiores.

Este medicamento deve ser guardado dentro da embalagem original, à temperatura entre 15 e 30°C, ao abrigo da luz e umidade.

Nestas condições, o prazo de validade do medicamento é de 24 meses, a partir da data de fabricação. Ao adquirir o medicamento, confira sempre o prazo de validade impresso na embalagem do produto.

**Nunca tome medicamento com prazo de validade vencido.**

**Após aberto, consumir até 08 dias.**

Informe seu médico a ocorrência de gravidez na vigência do tratamento ou após o seu término.

Informar ao médico se está amamentando.

"Não deve ser utilizado durante a gravidez e a amamentação, exceto sob orientação médica. Informe ao seu médico ou cirurgião-dentista se ocorrer gravidez ou iniciar amamentação durante o uso deste medicamento".

Siga a orientação do seu médico, respeitando sempre os horários, as doses e a duração do tratamento.

Não interromper o tratamento sem o conhecimento do seu médico.

Informe seu médico o aparecimento de reações desagradáveis.

**"TODO MEDICAMENTO DEVE SER MANTIDO FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS".**

Informe seu médico sobre qualquer medicamento que esteja usando, antes do início, ou durante o tratamento.

"Não há contra-indicação relativa a faixas etárias".

Este medicamento é contra-indicado nos casos de: hipersensibilidade conhecida a qualquer um dos componentes da fórmula, durante a gravidez, se estiver amamentando e em pacientes diabéticos.

**"NÃO TOME REMÉDIO SEM O CONHECIMENTO DO SEU MÉDICO, PODE SER PERIGOSO PARA A SAÚDE".**

## **INFORMAÇÃO TÉCNICA**

### **COMPOSIÇÃO**

O Ananas comosus associa, em sua composição, as enzimas com atividades proteolíticas: bromelina, ribonuclease, glucose-oxidase, invertase e diastase.

### **MECANISMO DE AÇÃO**

Contribui para a melhor fluidificação das secreções mucosas do paciente, graças às propriedades mucolíticas e fluidificantes destas enzimas, conforme pesquisas realizadas pela Universidade Federal de Pernambuco, Universidade de Pernambuco (estadual) e Universidade Federal da Paraíba. As enzimas bromelina, ribonuclease, glucose oxidase, invertase e diastase contidas no Ananas comosus, catalizam a quebra de ligações entre as ligações peptídicas, pela incorporação de moléculas de água, facilitando, assim a fluidificação do muco espesso.

A bromelina é uma endopeptidase que não necessita de sistema precursor para desempenhar suas atividades farmacológica e terapêutica. Além disso, o Ananas comosus contém os cátions divalentes dos oligoelementos magnésio, manganês, zinco, ferro e cálcio, que atuam como cofatores nas funções das referidas enzimas.

### **INDICAÇÕES**

**Bromelin®** está indicado como tratamento coadjuvante nas traqueobronquites e suas manifestações.

### **CONTRA-INDICAÇÕES**

- Pacientes com hipersensibilidade a qualquer um dos componentes da fórmula;
- Hipersensibilidade a Bromelina
- Gravidez e lactação;
- Pacientes diabéticos.

### **PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS**

Atenção: Este medicamento contém açúcar, portanto, deve ser usado com cautela em portadores de diabetes.

### **INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS**

Interações medicamentosas com uso de Bromelin® não foram observadas e/ou registradas.

### **REAÇÕES ADVERSAS/ COLATERAIS E ALTERAÇÕES DE EXAMES LABORATORIAIS**

Não existe registro de reações adversas, colaterais ou alterações de exames laboratoriais com o uso do Bromelin®.

### **POSOLOGIA**

#### **Crianças de 3 meses a 1 ano:**

2,5mL, 3 vezes ao dia.

#### **Crianças de 1 a 8 anos:**

5,0mL, 3 vezes ao dia.

#### **Crianças acima de 8 anos e adultos:**

10mL (copo-medida cheio), 3 vezes ao dia.

### **SUPERDOSAGEM**

Não existe registro de reações adversas com uso de superdosagem.

### **PACIENTES IDOSOS**

Pacientes idosos não precisam de cuidados especiais para usar o Bromelin® nas dosagens indicadas. MS 1.1557.0053

**Farm. Resp.:** Rosa Lúcia Carneiro da Silva - CRF-PE 1938

Bromelin® e Hebron® são marcas sob licença  
da Hebron Farmacêutica - Pesquisa,  
Desenvolvimento e Inovação Tecnológica  
CNPJ 05.314.980/0001-10

**Melxi** R\$ 19,60  
*Ananas comosus* L.  
 (suspensão oral)  
 MS: 1.1557.0054.001-5 – Suspensão oral (fr c/ 100ml)

### **Melxi®**

Medicamento de origem fitoterápica. Tem como princípio ativo *Ananas comosus* L., que associa, em sua composição, as enzimas com atividades proteolíticas: bromelina, ribonuclease, glucose-oxidase, invertase e diastase. Resultado de pesquisa realizada pela Universidade Federal de Pernambuco- UFPE e Universidade de Pernambuco UPE

## **MEDICAMENTO FITOTERÁPICO TRADICIONAL**

### **FORMA FARMACÊUTICA E APRESENTAÇÃO**

Suspensão oral: embalagem com frasco pet contendo 100mL, acompanhado de copo-medida.

### **USO PEDIÁTRICO OU ADULTO**

### **NOMENCLATURA BOTÂNICA OFICIAL (gênero, espécie, variedade, autor do binômio e família)**

*Ananas comosus* L. (Bromeliaceae)

### **PARTE UTILIZADA DA PLANTA**

Polpa da fruta.

### **COMPOSIÇÃO DO MEDICAMENTO, INDICANDO A RELAÇÃO REAL, EM PESO OU VOLUME DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL USADA E A CORRESPONDÊNCIA EM MARCADORES E/ OU PRINCÍPIOS ATIVOS, QUANDO CONHECIDOS.**

Concentrado de enzimas naturais.

Cada 1mL contém:

Extrato de *Ananas comosus*\* ..... 0,66g

Veículo q.s.p. .... 1 mL

(Nipagin, Nipazol, Mel de abelhas, Benzoato de sódio, Álcool etílico, Água purificada)

\* Equivalente a 4,4 x 10<sup>-6</sup>g de Bromelina.

### **INFORMAÇÃO AO PACIENTE**

O *Ananas comosus* é um produto fitoterápico com ação mucolítica e fluidificante das secreções brônquicas e das vias aéreas superiores.

Este medicamento deve ser guardado dentro da embalagem original, à temperatura entre 15 e 30°C, ao abrigo da luz e umidade.

Nestas condições, o prazo de validade do medicamento é de 24 meses, a partir da data de fabricação.

Ao adquirir o medicamento, confira sempre o prazo de validade impresso na embalagem do produto.

**Nunca tome medicamento com prazo de validade vencido. Após aberto, consumir até 08 dias.**

Informe seu médico a ocorrência de gravidez na vigência do tratamento ou após o seu término.

Informar ao médico se está amamentando.

"Não deve ser utilizado durante a gravidez e a amamentação, exceto sob orientação médica. Informe ao seu médico ou cirurgião-dentista se ocorrer gravidez ou iniciar amamentação durante o uso deste medicamento".

Siga a orientação do seu médico, respeitando sempre os horários, as doses e a duração do tratamento.

Não interromper o tratamento sem o conhecimento do seu médico.

Informe seu médico o aparecimento de reações desagradáveis.

**"TODO MEDICAMENTO DEVE SER MANTIDO FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS".**

Informe seu médico sobre qualquer medicamento que esteja usando, antes do início, ou durante o tratamento.

'Não há contra-indicação relativa a faixas etárias' .

Este medicamento é contra-indicado nos casos de: hipersensibilidade conhecida a qualquer um dos componentes da fórmula, durante a gravidez, se estiver amamentando e em pacientes diabéticos.

**"NÃO TOME REMÉDIO SEM O CONHECIMENTO DO SEU MÉDICO, PODE SER PERIGOSO PARA A SAÚDE".**

#### **INFORMAÇÃO TÉCNICA**

O Ananas comosus associa, em sua composição, as enzimas com atividades proteolíticas: bromelina, ribonuclease, glucose-oxidase, invertase e diastase. Contribui para melhor fluidificação das secreções mucosas do paciente, graças às propriedades mucolíticas e fluidificantes destas enzimas, conforme pesquisas realizadas pela Universidade Federal de Pernambuco, Universidade de Pernambuco (estadual) e Universidade Federal da Paraíba. As enzimas bromelina, ribonuclease, glucose oxidase, invertase e diastase contidas no Ananas comosus, catalizam a quebra de ligações entre as ligações peptídicas, pela incorporação de moléculas de água, facilitando, assim a fluidificação do muco espesso.

A bromelina é um endopeptidase que não necessita de sistema precursor para desempenhar sua atividade farmacológica e terapêutica. Além disso, o Ananas comosus contém os cátions divalentes dos oligoelementos magnésio, manganês, zinco, ferro e cálcio, que atuam como cofatores nas funções das referidas enzimas.

#### **INDICAÇÕES**

Melxi® está indicado como tratamento coadjuvante nas traqueobronquites e suas manifestações.

#### **CONTRA-INDICAÇÕES**

- Pacientes com hipersensibilidade a qualquer um dos componentes da fórmula;
- Hipersensibilidade a Bromelina;
- Gravidez e lactação;
- Pacientes diabéticos.

#### **PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS**

Atenção: Este medicamento contém mel de abelha, portanto, deve ser usado com cautela em portadores de Diabetes.

#### **INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS**

As interações medicamentosas não foram observadas e/ou registradas.

#### **REAÇÕES ADVERSAS/ COLATERAIS E ALTERAÇÕES DE EXAMES LABORATORIAIS**

Ainda não foram relatadas a intensidade e frequência das reações adversas, colaterais ou alterações de exames laboratoriais com o uso do Melxi®.

#### **POSOLOGIA**

**Crianças de 3 meses a 1 ano:**

2,5mL, 3 vezes ao dia.

**Crianças de 1 a 8 anos:**

5,0mL, 3 vezes ao dia.

**Crianças acima de 8 anos e adultos:**

10mL (copo-medida cheio), 3 vezes ao dia.

#### **SUPERDOSAGEM**

Não há perigo de superdosagem com o uso de Melxi®.

#### **PACIENTES IDOSOS**

Pacientes idosos não precisam de cuidados especiais para usar o Melxi® nas dosagens indicadas.

MS 1.1557.0054

Farm. Resp.: Rosa Lúcia Carneiro da Silva - CRF-PE 1938

---

Melxi® e Hebron® são marcas sob licença  
da Hebron Farmacêutica - Pesquisa,  
Desenvolvimento e Inovação Tecnológica  
CNPJ 05.314.980/0001